

PCT

ORGANISATION MONDIALE DE LA PROPRIÉTÉ INTELLECTUELLE  
Bureau international

## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

(51) Classification internationale des brevets C12N 9/02, 9/24, 15/53, 15/56, 15/82 5/10, A01H 5/00, A01N 63/00	A1	(11) Numéro de publication internationale: WO 94/13790 (43) Date de publication internationale: 23 juin 1994 (23.06.94)
(21) Numéro de la demande internationale: PCT/FR93/01203 (22) Date de dépôt international: 7 décembre 1993 (07.12.93) (30) Données relatives à la priorité: 92/14721 7 décembre 1992 (07.12.92) FR (71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US): ELF SANOFI [FR/FR]; 32-34, rue Marbeuf, F-75008 Paris (FR). SOCIÉTÉ NATIONALE ELF AQUITAINE [FR/FR]; Tour Elf, 2, place de la Coupole, La Défense 6, F-92400 Courbevoie (FR). (72) Inventeurs; et (75) Inventeurs/Déposants (US seulement): PIGNARD, Annie [FR/FR]; 3, rue du Canigou, F-31120 Roquettes (FR). GREZES-BESSET, Bruno [FR/FR]; 3, allée du Barcares, F-31770 Colomiers (FR). GRISON, René [FR/FR]; 13, rue de Naurouze, F-31750 Escalquens (FR). SCHNEIDER, Michel [CH/FR]; 26, rue Montardy, F-31000 Toulouse (FR). (74) Mandataires: GILLARD, Marie-Louise etc.; Cabinet Beau de Loménie, 158, rue de l'Université, F-75340 Paris Cédex 07 (FR).	(81) Etats désignés: AU, CA, JP, NZ, US, brevet européen (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).  Publiée Avec rapport de recherche internationale.	
(54) Title: USE OF A DNA SEQUENCE CODING FOR AN OXALIC ACID DEGRADING PROTEIN AS A SELECTION GENE		
(54) Titre: UTILISATION D'UNE SEQUENCE D'ADN CODANT POUR UNE PROTEINE SUSCEPTIBLE DE DEGRADER L'ACIDE OXALIQUE A TITRE DE GENE DE SELECTION		
(57) Abstract		
A novel use of a sequence coding for an oxalic acid degrading protein in order to select plant cells incorporating a gene of interest, and a novel method for selecting, on oxalic acid, cells, calli or plants transformed by the recombinant DNA.		
(57) Abrégé		
L'invention concerne la nouvelle utilisation d'une séquence codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique pour sélectionner des cellules végétales ayant intégré un gène d'intérêt et un nouveau procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cellules, des cals ou des plantes transformées par cet ADN recombinant.		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AT	Autriche	GB	Royaume-Uni	MR	Mauritanie
AU	Australie	GE	Géorgie	MW	Malawi
BB	Barbade	GN	Guinée	NE	Niger
BE	Belgique	GR	Grèce	NL	Pays-Bas
BF	Burkina Faso	HU	Hongrie	NO	Norvège
BG	Bulgarie	IE	Irlande	NZ	Nouvelle-Zélande
BJ	Bénin	IT	Italie	PL	Pologne
BR	Brazil	JP	Japon	PT	Portugal
BY	Bélarus	KE	Kenya	RO	Roumanie
CA	Canada	KG	Kirghizistan	RU	Fédération de Russie
CF	République centrafricaine	KP	République populaire démocratique de Corée	SD	Soudan
CG	Congo	KR	République de Corée	SE	Suède
CH	Suisse	KZ	Kazakhstan	SI	Slovénie
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	SK	Slovaquie
CM	Cameroun	LK	Sri Lanka	SN	Sénégal
CN	Chine	LU	Luxembourg	TD	Tchad
CS	Tchécoslovaquie	LV	Lettonie	TG	Togo
CZ	République tchèque	MC	Monaco	TJ	Tadjikistan
DE	Allemagne	MD	République de Moldova	TT	Trinité-et-Tobago
DK	Danemark	MG	Madagascar	UA	Ukraine
ES	Espagne	ML	Mali	US	Etats-Unis d'Amérique
FI	Finlande	MN	Mongolie	UZ	Ouzbékistan
FR	France			VN	Viet Nam
GA	Gabon				

**Utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique à titre de gène de sélection**

5 L'invention concerne une nouvelle utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique pour sélectionner des cellules végétales, en particulier des cellules végétales ayant intégré un gène d'intérêt et un nouveau procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cellules, des cals ou des plantes transformés.

10 Depuis l'avènement des premières plantes transgéniques en 1983, le nombre de celles-ci a connu une croissance accélérée. Les vecteurs de transformation qui ont été développés à cette époque et qui sont toujours utilisés, tels que par exemple le vecteur pBIN19 (M. Bevan, 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 8711-8721) font intervenir, comme gène de sélection des cellules végétales transformées, un gène de  
15 résistance à un antibiotique, la kanamycine. L'usage de ce mode de sélection, généralement facile à mettre en oeuvre, bon marché et applicable à de nombreuses espèces végétales, s'est très largement répandu dans les laboratoires de recherche.

20 Depuis que les premiers essais aux champs, donc hors confinement, de plantes transgéniques ont eu lieu en 1986, l'usage d'un gène de résistance à un antibiotique comme gène de sélection a fait l'objet de nombreuses critiques (cf. notamment F. Casse-Delbart et M. Tepfer, 1990, Biofutur, juin, 56-59 ainsi que J. Bryant et S. Leather, 1992, Tibtech, 10, 274-275). Le risque d'une transmission du  
25 gène de résistance de la plante transgénique à une bactérie du sol et, par la suite, à une bactérie potentiellement pathogène pour l'homme, bien qu'étant à priori très faible et encore jamais mis en évidence, n'est pas à négliger (J.A. Heinemann, 1991, TIG, 7, 181-185).

30 De nombreux substituts au gène de résistance à la kanamycine ont été proposés (M. Ratner, 1989, Bio-Technology, 7, 337-341) mais la plupart font intervenir, soit une résistance à un autre antibiotique (telle que par exemple la gentamycine, la streptomycine, le méthotrexate ou l'hygromycine), soit une résistance à un herbicide (tels que par exemple le bromoxynil ou la  
35 phosphinothricine), ce qui soulève des objections semblables. Une autre approche proposée a été l'élimination après usage du gène de résistance grâce à un système de recombinaison homologue (E.C. Dale et D.W. Ow, 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88, 10558-10562). Ce système, appelé système cre/lox, présente toutefois le

désavantage de nécessiter une transformation ultérieure des plantes transgéniques pour y introduire le gène cre responsable de la recombinaison, suivie d'une autofécondation des plantes afin de pouvoir faire ségréger dans les descendance ce gène cre du gène d'intérêt. Il n'est donc pas simple à utiliser. De plus, ce système laisse présent dans les plantes transgéniques une copie des séquences lox, lesquelles ne présentent aucun intérêt agronomique.

L'invention propose, comme gène de sélection des plantes transgéniques, un gène codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique, phytotoxine produite par de nombreuses espèces de champignons. Ce gène de sélection qui reste dans les plantes transgéniques présente un intérêt agronomique car il a un effet phytoprotecteur vis-à-vis de ces champignons.

L'invention concerne donc l'utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique à titre de gène de sélection de cellules végétales.

La protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique peut être une enzyme à activité décarboxylase, telle que notamment l'oxalate décarboxylase d'*Aspergillus* ou de *Collybia velutipes* ou de préférence une enzyme à activité oxydase, telle que par exemple l'oxalate oxydase d'orge (commercialisée par Boehringer, réf. 567 698), de sorgho (Chandra S. Pundier, 1991, Phytochemistry, 30, 4, p. 1065) ou de mousse [*Mnium menziesii* (M.F. Laker et al, 1980, Clinical Chemistry, 26, 7, 827)].

Une protéine à activité oxalate oxydase particulièrement appréciée est la protéine de séquence [SEQ ID N°1] :

Met	Gly	Tyr	Ser	Lys	Thr	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Phe	Ala	Met	Leu	Leu	1	5	10	15
Leu	Ala	Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Asp	Pro	Asp	Pro	Leu	Gln	Asp	Phe	20	25	30	
Cys	Val	Ala	Asp	Leu	Asp	Gly	Lys	Ala	Val	Ser	Val	Asn	Gly	His	Thr	35	40	45	
Cys	Lys	Pro	Met	Ser	Glu	Ala	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Lys	50	55	60	
Leu	Ala	Lys	Ala	Gly	Asn	Thr	Ser	Thr	Pro	Asn	Gly	Ser	Ala	Val	Thr	65	70	75	80

Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr Asn Thr Leu Gly Val Ser  
                             85                            90                            95  
 Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly Thr Asn Pro Pro His Ile  
                             100                            105                            110  
 5 His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Ile Val Met Lys Gly Glu Leu Leu  
                             115                            120                            125  
 Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Arg  
                             130                            135                            140  
 Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ile Pro Arg Gly Leu Met His  
 10 145                            150                            155                            160  
 Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala Ser Met Val Val Ser Phe  
                             165                            170                            175  
 Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val Pro Leu Thr Leu Phe Gly  
                             180                            185                            190  
 15 Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu Thr Lys Ala Leu Arg Val  
                             195                            200                            205  
 Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser Lys Phe Ala Ala Gly Phe  
                             210                            215                            220

20 ou de séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence [SEQ ID N°1].

La séquence [SEQ ID N°1] est celle de la germinine de blé, protéine induite pendant la germination du blé, dont la séquence a été décrite par E. Dratewka-Kos,  
 25 1989, J. Biol. Chem, 264, 4896-4900 et J.G. Lane, 1991, J. Biol. Chem., 266, 10461-10469.

Un degré d'homologie élevé signifie ici une homologie (rapport entre les acides aminés identiques et le nombre total d'acides aminés) d'au moins 80 % des  
 30 séquences d'acides aminés, lorsqu'elles sont alignées d'après l'homologie maximale, selon la méthode d'alignement optimal des séquences de Needleman et Wunsch, 1970, J. Mol. Biol, 48, 443-453. Cette méthode est notamment utilisée dans le logiciel UWGCG de l'Université du Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl. Ac. Res., 12, 387-395 - option GAP.

35

Un exemple de protéine présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence [SEQ ID N°1] est celle de l'oxalate oxydase d'orge dont la séquence est décrite dans la demande de brevet WO 92/14824 (cette séquence présente une

homologie de 96 % avec la séquence [SEQ ID N°1]), ou celle d'autres oxalate oxydases de céréales proches du blé.

Compte tenu de la dégénérescence du code génétique il existe un grand nombre de séquences nucléotidiques codant pour l'oxalate oxydase de séquence [SEQ ID N°1]. Parmi celles-ci on apprécie particulièrement la séquence [SEQ ID N°2]

	ATGGGGTACT CCAAACCCT AGTAGCTGGC CTGTTCCGAA TGCTGTTACT AGCTCCGGCC	60
10	GTCTTGCCA CCGACCCAGA CCCTCTCCAG GACTTCTGTG TCGCCGACCT CGACGGCAAG	120
	GCGGTCTCGG TGAACGGGCA CACGTGCAAG CCCATGTGG AGGCCGGCGA CGACTTCCTC	180
	TTCTCGTCAA AGTTGGCCAA GGCCGGCAAC ACGTCCACCC CGAACGGCTC CGCCGTGACG	240
	GAGCTCGACG TGGCCGAGTG GCCCGGTACC AACACGCTGG GTGTGTCCAT GAACCGCGTG	300
	GACTTTGCTC CCGGAGGCAC CAACCCACCA CACATCCACC CGCGTGCCAC CGAGATCGGC	360
15	ATCGTGATGA AAGGTGAGCT TCTCGTGGGA ATCCTTGGCA GCCTCGACTC CGGGAACAAG	420
	CTCTACTCGA GGTGTTGCG CGCCGGAGAG ACGTTCCTCA TCCACGGGG CCTCATGCAC	480
	TTCCAGTTCA ACGTCGGTAA GACCGAGGCC TCCATGGTCG TCTCCTTCAA CAGCCAGAAC	540
	CCCGGCATTG TCTTCGTGCC CCTCACGCTC TTCGGCTCCA ACCCGCCCAT CCAACGCCG	600
	GTGCTACCA AGGCACTCCG GGTGGAGGCC AGGTCGTGG AACTTCTCAA GTCCAAGTTT	660
20	GCCGCTGGGT TT	672

Selon une variante de l'invention, la séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique peut être utilisée en combinaison avec une séquence d'intérêt.

25

Ainsi selon cette variante, l'invention concerne l'utilisation de la séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique pour sélectionner des cellules végétales transformées avec une séquence d'intérêt, la transformation étant réalisée soit à l'aide de deux vecteurs distincts portant l'un la séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique, l'autre la séquence d'intérêt, soit avec un seul vecteur contenant les deux séquences ci-dessus, ce vecteur étant ci-après dénommé ADN recombinant.

30

La séquence d'intérêt est toute séquence d'ADN procurant un avantage aux cellules végétales lorsqu'elle est intégrée dans leur génome. Elle peut être par exemple une séquence régulatrice avantageuse. Elle peut être aussi une séquence codant pour une protéine d'intérêt ou pour un précurseur de cette dernière.

35

Selon un mode de réalisation préféré de l'invention, la séquence d'intérêt confère aux plantes une résistance aux agents pathogènes, tels que les champignons, les bactéries, ainsi que les arthropodes, notamment les insectes et les nématodes.

5

Une telle séquence d'intérêt peut être par exemple une séquence codant pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière. On sait en effet, comme décrit dans la demande de brevet WO 92/01792, qu'une telle protéine a un effet phytoprotecteur car elle est capable de dégrader la chitine, polymère polysaccharidique constitué d'unités N-acétyl-glucosamine associées par des liaisons  $\beta$ -1,4, qui est un composé structural important de la paroi de la plupart des champignons pathogènes, de l'exosquelette des arthropodes, en particulier des insectes, et de l'enveloppe externe des oeufs et des cystes de nématodes.

15

Une séquence intéressante codant pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière, est celle décrite dans la demande de brevet WO 92/01792, qui code pour une protéine comprenant la séquence [SEQ ID N°3] ; cette séquence [SEQ ID N°3] correspond à la séquence [SEQ ID N°1] de la demande WO 92/01792.

20

On apprécie particulièrement que cette séquence code pour un précurseur d'une protéine à activité endochitinase, qui comprend, en amont de la séquence [SEQ ID N°3], le peptide signal de séquence [SEQ ID N°4] ; ce peptide-signal correspond au peptide signal ayant la séquence [SEQ ID N°3] décrite dans la demande WO 92/01792.

25

Il est alors avantageux que le peptide signal de séquence [SEQ ID N°4] soit séparé de la protéine à activité chitinase de séquence [SEQ ID N°3], par le peptide de séquence [SEQ ID N°5] ; ce peptide correspond au peptide ayant la séquence [SEQ ID N°2] décrite dans la demande WO 92/01792.

30

Parmi les nombreuses séquences nucléotidiques qui codent pour un précurseur de la protéine de séquence [SEQ ID N°3] comprenant en amont de celle-ci le peptide signal de séquence [SEQ ID N°4], séparé de la protéine de séquence [SEQ ID N°3] par le peptide de séquence [SEQ ID N°5], la séquence d'ADN [SEQ ID N°6] est particulièrement préférée. Cette séquence, qui correspond à la séquence SEQ ID N°4 décrite dans la demande WO 92/01792, comporte deux introns en position 443-521 et en position 676-756

35

Une autre séquence codant pour une protéine à activité endochitinase ou pour un précurseur de cette dernière est celle de la chitinase d'Aphanocladium album décrite dans la demande EP-A1-531 218 qui comprend la séquence [SEQ ID N°7]. Cette séquence correspond à la séquence [SEQ ID N°1] de la demande EP-A1-531 218.

On apprécie particulièrement que cette séquence code pour un précurseur d'une protéine à activité endochitinase, qui comprend, en amont de la séquence [SEQ ID N°7], le peptide signal de séquence [SEQ ID N°8]. Ce peptide signal correspond au peptide signal ayant la séquence [SEQ ID N°4] de la demande EP-A1-531 218.

Il est alors avantageux que le peptide signal de séquence [SEQ ID N°8] soit séparé de la protéine à activité chitinase de séquence [SEQ ID N°7], par le peptide de séquence [SEQ ID N°9]. Ce peptide correspond au peptide ayant la séquence [SEQ ID N°5] décrite dans la demande EP-A1-531 218.

Parmi les nombreuses séquences nucléotidiques qui codent pour la protéine de séquence [SEQ ID N°7], une séquence particulièrement appréciée est la séquence d'ADN [SEQ ID N°10] qui correspond à la séquence [SEQ ID N°6] décrite dans la demande EP-A1-531 218.

Une autre séquence d'intérêt intéressante qui confère aux plantes une résistance aux agents pathogènes est celle qui code pour une protéine à activité  $\beta$ -1,3-glucanase ou pour un précurseur de cette dernière. On sait en effet, comme décrit dans la demande de brevet WO-92 16632, qu'une telle protéine a un effet phytoprotecteur car elle est capable de dégrader les  $\beta$ -1,3-glucanes, polymères polysaccharidiques constitués d'unités glucose associées par des liaisons  $\beta$ -1,3 présentant parfois des ramifications de type  $\beta$ -1,4 ou  $\beta$ -1,6, qui sont un composé structural important de la paroi de la plupart des champignons, et notamment des champignons phytopathogènes.

Une telle séquence avantageuse est celle décrite dans la demande de brevet WO 92/16 632, qui code pour une protéine comprenant la séquence [SEQ ID N° 11]. Cette séquence correspond à la séquence (a<sub>1</sub>) décrite dans la demande WO 92/16 632.



Il est intéressant que cette séquence d'intérêt comprenne, immédiatement en aval de la séquence codant pour la séquence [SEQ ID N° 11], la séquence [SEQ ID N° 12] éventuellement tronquée dans sa partie carboxy-terminale de 0 à 27 acides aminés. Cette séquence [SEQ ID N° 12] correspond à la séquence (a<sub>4</sub>) décrite dans la demande WO 92/16 632.

Cette séquence d'intérêt comprend alors de préférence, immédiatement en amont de la séquence codant pour la séquence [SEQ ID N° 11], un codon CAA ou CAG codant pour Gln.

Une séquence de ce type particulièrement appréciée est celle codant pour une protéine à activité  $\beta$ -1,3-glucanase ou un précurseur de cette dernière qui comprend la séquence [SEQ ID N° 13]. Cette séquence correspond à la séquence (a<sub>5</sub>) décrite dans la demande WO 92/16 632.

On apprécie particulièrement que cette séquence code pour un précurseur d'une protéine à activité  $\beta$ -1,3-glucanase qui comprend en amont de la séquence [SEQ ID N° 13], le peptide signal de séquence [SEQ ID N° 14]. Ce peptide signal correspond au peptide signal ayant la séquence (a<sub>2</sub>) décrite dans la demande WO 92/16 632.

Parmi les nombreuses séquences nucléotidiques qui codent pour la protéine de séquence [SEQ ID N° 13], une séquence avantageuse est la séquence d'ADN [SEQ ID N° 15] qui correspond à la séquence (Na<sub>1</sub>) décrite dans la demande WO 92/16 632.

L'ADN recombinant défini ci-dessus, comprenant le gène codant pour l'oxalate oxydase flanqué des signaux nécessaires à son expression ainsi qu'une séquence d'intérêt, est introduit dans les cellules végétales à transformer. Lorsque la séquence d'intérêt code pour une protéine ou un précurseur de celle-ci, elle comprend également les signaux nécessaires à son expression. La construction contenant ces séquences peut être réalisée dans un vecteur unique ou dans des vecteurs différents qui seront utilisés pour la transformation.

Le promoteur est de préférence un promoteur constitutif fort, par exemple le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur, ou un promoteur commandant une expression tissu ou organe spécifique comme le promoteur de la petite sous-unité de la ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase qui

s'exprime préférentiellement dans les feuilles et tout particulièrement les tissus du mésophylle (Kuhlemeier et al., 1987, Ann. Rev. Plant Physiol, 38, 221-257). On peut également utiliser un promoteur spécifique commandant par exemple une expression dans les graines ou au cours d'un stade précis du développement de la

5 plante, ou un promoteur inductible à la suite d'un choc thermique, d'une blessure ou de l'interaction entre la plante et des parasites (Kuhlemeier et al., 1987, référence citée ci-dessus), si une expression de l'ADN recombinant est recherchée dans ces situations.

10 On utilise la séquence terminatrice, comportant des sites de polyadénylation, pouvant être isolée de gènes végétaux ou de gènes s'exprimant dans les végétaux, comme par exemple le terminateur du gène de la nopaline synthase d'Agrobacterium tumefaciens.

15 Une bactérie, par exemple de l'espèce Escherichia coli, qui contient l'ADN recombinant défini ci-dessus avec les moyens permettant sa répllication peut servir au clonage de cet ADN recombinant et une bactérie susceptible d'infecter une plante avec transfert de matériel génétique, par exemple de l'une des espèces Agrobacterium rhizogenes et Agrobacterium tumefaciens, qui contient cet ADN

20 dans un contexte permettant sa répllication peut servir à transformer des cellules végétales. La transformation des cellules végétales par l'ADN recombinant ci-dessus peut également être effectuée par une autre méthode biologique telle que la voie du tube pollinique (Zhong-xun Luo et al., Plant Molec. Biol. Rep., 1988, 6, 165-176), la transformation directe de graines en germination (Toepfer R. et al.,

25 1989, The Plant Cell., 1, 133-139), ou par une méthode physique telle que l'utilisation de polyéthylèneglycol, de l'électroporation (Chistou P. et al., 1987, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 84, 3662-3699) ou du bombardement à l'aide de microprojectiles (Klein T.M. et al., 1988, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 85,8502-8505).

30 L'invention concerne donc également une cellule végétale, caractérisée en ce qu'elle est transformée par l'ADN recombinant défini précédemment, avec les moyens nécessaires à l'expression de la protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique et de la protéine d'intérêt ou du précurseur de cette dernière; une telle cellule peut être sélectionnée sur un milieu contenant de l'acide oxalique. Cette

35 cellule végétale peut provenir d'une espèce de grande culture, telle que par exemple le maïs, le soja, la betterave, le blé, l'orge, le pavot, le colza, le tournesol, la luzerne et le sorgho, d'une espèce florale, telle que le rosier, l'oeillet, le gerbera ou d'une espèce potagère, telle que la carotte, la tomate, la salade, la chicorée, le poivron, le

melon et le chou. Des espèces particulièrement appréciées sont le colza Brassica napus, le tournesol Helianthus annuus et le tabac Nicotiana tabacum.

5 L'étape de transformation qui concerne une ou plusieurs cellules est suivie d'une étape de multiplication de ces cellules transformées de façon à obtenir des cals, lesquels peuvent donner naissance à des plantes transformées par des processus d'organogénèse ou d'embryogénèse.

10 L'invention concerne donc aussi une plante ou une partie de plante, caractérisée en ce qu'elle contient l'ADN recombinant défini précédemment, avec les moyens nécessaires à l'expression du gène codant pour la protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique et du gène codant pour la protéine d'intérêt ou du précurseur de cette dernière et en ce qu'elle a été sélectionnée sur un milieu contenant de l'acide oxalique. Une partie de plante particulièrement appréciée est la  
15 partie apte à former une nouvelle plante complète, notamment après semis, enfouissement ou repiquage, ou à produire des semences. Une telle partie est par exemple un grain, une graine, une semence, une bouture, une marcotte. Ces plantes peuvent être plus particulièrement des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

20 La protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique peut être une enzyme à activité décarboxylase, telle que notamment l'oxalate décarboxylase d'Aspergillus ou de Collybia velutipes ou de préférence une enzyme à activité oxydase, telle que par exemple l'oxalate oxydase d'orge (commercialisée par Boehringer, réf. 567 698),  
25 de sorgho (Chandra S. Pundier, 1991, Phytochemistry, 30, 4, p. 1065) ou de mousse (Mnium menziesii) (M.F. Laker et al, 1980, Clinical Chemistry, 26, 7, 827). Une protéine à activité oxalate oxydase particulièrement appréciée est la protéine de séquence [SEQ ID N°1], ou une séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence [SEQ ID N°1]. Celle-ci est avantageusement codée par la  
30 séquence d'ADN [SEQ ID N°3].

L'acide oxalique est une phytotoxine produite par de nombreux champignons pathogènes, tels que notamment Sclerotinia sclerotiorum (B. Grezes-Besset, 1988, Thèse de Doctorat, Université Paul Sabatier, Toulouse, ainsi que G. Goday et al,  
35 1990, Physiological and Molecular Plant Pathology, 37, 179-191), Sclerotium rolfsii (D.F. Bateman et al, 1965, Phytopathology, 68, 1597-1599), Aspergillus niger (I.A.S. Gibson, 1953, Transactions British Mycological Society, 36, 198-209),

Cristulariella pyramidalis (P. Kurian et al, 1979, Phytopathology, 69, 712-714) et Cryphonectria parasitica (A.R. Bennett et al, 1990, Mycologia, 358-363).

5 L'invention a également trait à un procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cellules, des cals ou des plantes transformées par un ADN recombinant défini précédemment, caractérisé en ce que, dans le milieu de sélection, le calcium est sous forme soluble.

10 Les plantes peuvent provenir d'une espèce de grande culture, telle que par exemple le maïs, le soja, la betterave, le blé, l'orge, le pavot, le colza, le tournesol, la luzerne et le sorgho, d'une espèce florale, telle que le rosier, l'oeillet, le gerbera ou d'une espèce potagère, telle que la carotte, la tomate, la salade, la chicorée, le poivron, le melon et le chou. Des espèces particulièrement appréciées sont le colza Brassica napus, le tournesol Helianthus annuus et le tabac Nicotiana tabacum.

15 Le milieu de sélection comprend de l'acide oxalique et tous les éléments nécessaires à la multiplication et la différenciation des cellules végétales et notamment du calcium indispensable pour leur développement, qui doit donc rester disponible. En présence d'acide oxalique le calcium a tendance à s'associer à ce  
20 dernier pour former un sel d'oxalate insoluble, ce qui le rend indisponible pour les cellules végétales. Il est donc nécessaire que le milieu de sélection contienne des agents permettant de garder le calcium sous forme soluble.

25 De préférence ces agents sont des agents chélateurs ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle de l'acide oxalique. Ceux-ci doivent bien sûr, de plus, ne pas être toxiques pour les cellules.

Des exemples d'agents chélateurs ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle de l'acide oxalique sont l'EDTA et l'EGTA. Dans le cas du  
30 tournesol, l'EGTA est un agent chélateur particulièrement apprécié.

Ainsi selon un autre aspect, l'invention a pour objet un procédé pour sélectionner sur acide oxalique des cals ou des plantes transformées par une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique,  
35 qui consiste à cultiver les cals ou les plantes sur un milieu contenant de l'acide oxalique et du calcium en présence d'un agent chélateur ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle de l'acide oxalique.

Selon une variante préférée, les plantes sont transformées avec une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique associée à une séquence d'intérêt telle que définie précédemment, en particulier une séquence codant pour une protéine d'intérêt.

5

L'invention sera mieux comprise à l'aide de l'exposé ci-après, divisé en sections, qui comprend des résultats expérimentaux et une discussion de ceux-ci. Certaines de ces sections concernent des expériences effectuées dans le but de réaliser l'invention, d'autres des exemples de réalisation de l'invention, donnés bien sûr à titre purement illustratif.

10

Dans cette partie expérimentale on utilise le clone gf-2.8 de la germine de blé décrite par B.G. Lane et al, 1991, J. Biol. Chem., 226- 10461-10469 ; la séquence de l'ADN génomique de ce clone est la séquence [SEQ ID N°16] et la

15

séquence peptidique traduite est la séquence [SEQ ID N° 17].

Une grande partie de l'ensemble des techniques ci-après, bien connues de l'homme de l'art, est exposée en détail dans les ouvrages de Sambrook et al. : "Molecular Cloning : a Laboratory Manual", publié en 1989 par les éditions Cold Spring Harbor Press à New-York (2ème édition), et dans l'ouvrage de Gelvin et al: "Plant Molecular Biology Manual", publié en 1988 par les éditions Kluwer Academics.

20

## **SECTION 1 : Purification et caractérisation partielle de l'oxalate oxydase d'orge**

25

### 1) Purification de l'oxalate oxydase d'orge

Une oxalate oxydase d'orge a été purifiée jusqu'à homogénéité à partir d'une préparation commerciale enrichie en activité oxalate oxydase (Boehringer, ref 567 698) préparée à partir de grains d'orge en germination. La protéine est purifiée selon le protocole décrit ci-après :

30

#### **Etape 1 :**

35

La préparation commerciale lyophilisée est solubilisée dans l'eau puis équilibrée dans un tampon acétate 10mM de pH 5,2 par passage dans une mini-colonne à base de Sephadex G25 prête à l'emploi (NAP 10-Pharmacia). Cet extrait

est fractionné par chromatographie sur une colonne d'échange d'ions à base de polymère synthétique (colonne Mono S HR5/5 de Pharmacia). Après dépôt de l'échantillon, les protéines non retenues sont éluées par le tampon acétate de sodium 10mM de pH 5,2. Les protéines retenues sur la colonne sont éluées par un  
5 gradient linéaire de 10 à 500mM de tampon acétate de sodium de pH 5,2.

L'éluat est analysé en ligne par son absorbance à 280 nm et les fractions collectées sont caractérisées : teneur en protéines mesurée par la technique colorimétrique de Bradford (1976, Anal. Biochem., 72 , 248-252), activité oxalate  
10 oxydase mesurée selon la technique de Suguira et al., 1979, Chem. Pharm. Bull. , 79 , 2003-2007, décrite au point 2) ci-après. Chaque fraction est caractérisée, après électrophorèse en conditions dénaturantes (SDS) et coloration à l'argent, par sa mobilité électrophorétique comparée à des protéines de référence.

#### 15 Etape 2 :

Les fractions présentant une activité oxalate oxydase et éluées à une concentration d'acétate de sodium comprise entre 200mM et 275mM sont rassemblées puis concentrées par centrifugation sur un système Centricon-10  
20 (Amicon-réf. 4205). L'extrait est ensuite fractionné par chromatographie d'exclusion sur une colonne Superdex 75 (Pharmacia). Les fractions collectées sont analysées selon les méthodes décrites à l'étape 1.

A l'issue de la purification, on obtient une protéine unique, qui présente une  
25 activité oxalate oxydase, d'un poids moléculaire apparent de  $26 \pm 3$  kDa (poids moléculaire déterminé après électrophorèse sur gel de polyacrylamide à 15 % en présence de SDS et révélation à l'argent).

#### 30 2) Mesure de l'activité oxalate oxydase

L'activité oxalate oxydase est mesurée d'après la méthode décrite par Suguira et al. , 1979, Chem. Pharm. Bull. , 79 , 2003-2007, et résumée ci-après. L'extrait enzymatique est incubé en présence de 75  $\mu$ l d'oxalate de sodium (à 0,18 % dans du tampon succinate 100mM de pH 4,0) et de tampon succinate 100mM de  
35 pH 4,0, en quantité suffisante pour avoir un volume de mélange réactionnel égal à 1,5 ml.

Après 10 minutes d'incubation du mélange réactionnel à 37°C, on ajoute successivement 100 µl de tampon Tris 1 M de pH 8,9, puis 1 ml de réactif préparé extemporanément et constitué de : 8 mg de 4-aminoantipyrine, 6 mg de peroxydase de raifort (Sigma, ref P8250), 80 µl de diméthylaniline préparés dans  
5 100 ml de tampon phosphate 0.1 M de pH 7,0.

L'activité enzymatique est estimée par la mesure spectrophotométrique de l'absorbance à 530 nm. Elle est exprimée en unité d'oxalate oxydase/mg de protéine (Une unité d'oxalate oxydase (U oxox) est la quantité d'enzyme qui convertit 1  
10 µmole d'oxalate en peroxyde d'hydrogène en 1 minute à 37°C et à pH 3,8)

### 3) Caractérisation de la protéine purifiée

#### a) Préparation d'anticorps polyclonaux

15

25 µg de la protéine d'orge purifiée jusqu'à homogénéité et ayant une activité oxalate oxydase sont injectés à un lapin dans 500 µl d'adjuvant complet de Freund (Sigma, ref F5881)

20

Trois injections de rappel de 25 µg dans l'adjuvant incomplet de Freund (500 µl) (Sigma, ref F5506) ont été réalisées à 3 semaines d'intervalle. L'immunsérum a été prélevé 3 semaines après la dernière injection.

Cet immunsérum reconnaît spécifiquement l'oxalate oxydase. Il permet de  
25 révéler cette protéine par la technique de Western blot (décrite dans la Section 2.4) b) à partir d'un extrait de protéines totales d'embryons d'orge en germination.

#### b) Détermination de la séquence partielle de l'oxalate oxydase

30

Un échantillon de la protéine de  $26 \pm 3$  kDa ayant une activité oxalate oxydase est traité au bromure de cyanogène et les oligopeptides libérés sont séparés par HPLC phase inverse sur une colonne C4 Brownlee. La séquence N-terminale de la protéine ainsi que celle d'un peptide interne sont déterminées grâce à un séquenceur de protéines (Modèle 470A, Applied Biosystems, USA) équipé  
35 d'un chromatographe (Modèle 120A, Applied Biosystems) qui analyse en continu les dérivés phénylthiohydantoïques formés après chaque cycle de dégradation.

La séquence aminoterminal déterminée est la [SEQ ID N° 18] suivante :

Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe Xaa Val Ala Asp Leu Asp Gly  
Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr Xaa Lys Pro Met Ser Glu Ala  
5 Gly Asp Asp Phe Leu Phe

Xaa étant un acide aminé non déterminé.

La séquence d'un peptide interne est la séquence [SEQ ID N° 19] suivante :

10

Ala Gly Glu Thr Phe Val Ile Pro Arg

Après comparaison avec la banque des séquences protéiques connues (banque Swiss-Prot) en utilisant l'option GAP du logiciel UWGCG de l'Université du Wisconsin : Devereux et al., 1984, Nucl. Acids Res., 12 , 387-395, une homologie d'au moins 94 % est trouvée avec la séquence d'une protéine de blé induite au cours de la germination, la germine, décrite par Lane et al, 1991 J. Biol. Chem., 226, 10461-10469.

20 **SECTION 2 : Transformation du tabac par le gène de la germine de blé, sélection sur acide oxalique des cals et des plantes transgéniques**

### 1) Construction d'un vecteur de transformation

25

#### a) Préparation de la séquence codant pour la germine de blé

Le fragment d'ADN HindIII - SphI de 745 paires de bases du clone gf-2.8 décrit par B.G. Lane et al, (1991, J. Biol. Chem., 226, 10461-10469) portant la séquence codant pour la germine de blé a été purifié par électrophorèse sur gel d'agarose suivie par une extraction au moyen du kit "Geneclean" (Bio 101, ref 3105) selon le protocole du fabricant. Ce fragment comporte 19 paires de bases en amont de l'ATG initiateur ainsi que 54 paires de bases en aval du codon stop. Ce fragment a été inséré à l'aide de l'ADN ligase T4 entre les sites HindIII et SphI du site de clonage multiple d'un vecteur pTZ19R (commercialisé par Pharmacia), dont le site BamHI a été détruit par remplissage grâce à la polymérase de Klenow, selon les méthodes bien connues de l'homme de l'art. Le plasmide ainsi créé est appelé plasmide pPH096. Le site HindIII présent dans ce plasmide est ensuite ouvert, et un

30

35



nouveau site BamHI recréé par l'adjonction d'un oligonucléotide de séquence suivante [SEQ ID N°20] : AGCTGGATCC

5 Le vecteur obtenu, appelé plasmide pPH098, est cloné dans la souche E. coli JM 109 (Clontech). Après vérification de la séquence nucléotidique du fragment cloné, la partie codante est repurifiée sous la forme du fragment de restriction BamHI-SacI de 789 paires de bases. Ce fragment contient la séquence codant pour le peptide signal, ainsi que celle codant pour la germinine mature tels qu'ils sont décrits par B. Lane et al, 1991, J. Biol. Chem., 226, 10461-10469.

10

b) Préparation de la séquence promotrice comprenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque du chou-fleur

15 A partir du plasmide pBI121 (Clontech) par coupure à l'aide des endonucléases HindIII et BamHI, puis électrophorèse sur gel d'agarose, le fragment HindIII-BamHI d'environ 900 paires de bases, contenant le promoteur 35S du virus de la mosaïque de chou-fleur, est isolé. Ce fragment est recoupé par HindIII. Le fragment d'environ 410 paires de bases, portant le site BamHI, est traité par l'ADN ligase T4 en présence d'un linker HindIII (séquence synthétique contenant un site  
20 HindIII). Après coupure par l'endonucléase HindIII et électrophorèse sur gel d'agarose, le fragment HindIII-BamHI résultant, d'environ 420 paires de bases, est isolé et purifié.

25 c) Préparation de la séquence terminatrice comprenant le terminateur du gène de la nopaline synthase (NOS) d'Agrobacterium tumefaciens

A partir du plasmide pBI121 (Clontech), par coupure à l'aide des enzymes de restriction SacI et EcoRI, puis électrophorèse sur gel d'agarose, un fragment de 250  
30 paires de bases environ, renfermant le terminateur du gène de la nopaline synthase, a été isolé.

d) Clonage dans le vecteur binaire pBIN19

35 On a ligué à l'aide de l'ADN ligase T4 la séquence promotrice (cf. ci-dessus 1) b)), la séquence codant pour la germinine (cf. ci-dessus 1) a)) et la séquence terminatrice (cf. ci-dessus 1) c)), dans le vecteur binaire pBIN19 (Bevan, 1984, Nucl. Acid Res., 12, 8711-8721), ouvert à l'aide des endonucléases HindIII et

EcoRI. Ce vecteur porte deux gènes de résistance à la kanamycine, l'un pouvant s'exprimer dans les bactéries, l'autre situé immédiatement en amont du gène recombinant complet pouvant être transféré aux cellules végétales. Ce gène de résistance à la kanamycine servira à vérifier que les plantules régénérées obtenues après sélection sur acide oxalique à l'aide du gène codant pour l'oxalate oxydase sont effectivement transformées.

Le vecteur obtenu, appelé pPH100, est cloné dans la souche E. coli HB 101 (Clontech).

## 2) Transformation d'Agrobacterium tumefaciens

La transformation est réalisée selon la méthode de congélation-décongélation décrite dans Plant Molecular Biology Manual (Gelvin et al, op. cité) et résumée ci-après.

Des cellules compétentes d'Agrobacterium tumefaciens (souche LBA 4404, Clontech) sont préparées par refroidissement rapide dans la glace d'une culture en phase exponentielle de croissance. Les bactéries sont alors remises en suspension dans une solution de  $\text{CaCl}_2$  20mM. Des parties aliquotes de cette suspension sont distribuées dans des tubes Eppendorf, puis congelées dans l'azote liquide.

1  $\mu\text{g}$  de plasmide pPH100 est ajouté aux cellules congelées, contenues dans un tube Eppendorf. La suspension est ensuite incubée à 37°C pendant 5 min ; 1 ml de milieu Luria (Gibco) est alors rajouté et le tube est incubé à 28°C pendant 4 h. Des parties aliquotes sont étalées sur des boîtes de Pétri contenant un milieu minimum gélosé, décrit dans Plant Molecular Biology Manual (op. cité), en présence de 100 mg de rifampicine et 25 mg/l de kanamycine. Dans ces conditions, seules poussent les colonies d'Agrobacterium tumefaciens ayant intégré le plasmide pPH100. Celles-ci contiennent le gène chimérique dans un contexte permettant sa réplication.

La résistance aux deux antibiotiques des colonies sélectionnées est vérifiée en repiquant celles-ci sur le même milieu de sélection deux fois de suite. La présence du gène chimérique associant le promoteur 35S à la partie codante de la germine de blé dans Agrobacterium tumefaciens est vérifiée par la méthode de Southern Blot sur une préparation d'ADN total (lyse des cellules, purification de l'ADN par extraction à l'aide du mélange phénol/chloroforme, selon le protocole

décrit par Gelvin dans l'ouvrage cité ci-dessus, coupure de l'ADN purifié à l'aide d'enzymes de restriction, électrophorèse sur gel d'agarose, transfert sur membrane et hybridation, selon les techniques bien connues de l'homme de l'art).

5            3) Transformation du tabac

          Du tabac Nicotiana tabacum cultivé in vitro a été infecté par Agrobacterium tumefaciens contenant le plasmide pPH100 selon la procédure de Horsch et al., bien connue de l'homme du métier (Horsch R.B. et al., 1985 Science 227, 1229-10 1231), dont les principales étapes sont exposées ci-après.

          Des disques de feuilles de plantes axéniques de tabac Nicotiana tabacum (variété Wisconsin Havana 38) sont incubés dans une culture d'A. tumefaciens hébergeant le plasmide pPH100. Les disques égouttés sur papier Whatman sont 15 mis en culture sur des milieux de culture en boîtes de Pétri afin de multiplier les cellules transformées de façon à obtenir des cals. Ces cals sont ensuite transférés sur du milieu contenant de la céfotaxime à 500 µg/ml destinée à décontaminer les tissus végétaux (élimination des Agrobacterium tumefaciens) et de la kanamycine à 100 µg/ml pour sélectionner le matériel transgénique. Des pousses transformées se 20 développent à partir de ces cals ; les plantes qui en sont issues sont transférées en serres.

4) Mise en évidence de l'expression du gène de la germinine dans le tabac transgénique

25

          a) Préparation des extraits de protéines de tabacs transformés et de tabacs témoins

          Les fragments de tissus (cals et feuilles de plantes) ont été congelés dans 30 l'azote liquide, réduits en poudre et stockés à -20°C.

          Pour la réalisation d'électrophorèses, l'oxalate oxydase est extraite directement à partir de la poudre végétale par le tampon de charge de Laemmli (référence ci-dessous).

35

Pour les dosages d'activité oxalate oxydase, l'extrait enzymatique est réalisé par mise en suspension de la poudre végétale dans un tampon succinate 0,05M, pH 4.

- 5 Pour les dosages de protéines, l'extrait végétal, en suspension dans le tampon succinate ci-dessus, est centrifugé à 10 000 g pendant 5 min.

- 10 La concentration des protéines totales est déterminée sur les surnageants, appelés ci-après les extraits bruts de protéines, en suivant la technique de Bradford (Bradford M.M., 1976, Anal. Biochem., 72, 248-254).

b) Immunodétection de l'oxalate oxydase (Western blot) dans des  
cals et dans des plantes

- 15 On soumet les extraits bruts de protéines à un Western blot, technique bien connue de l'homme de l'art et décrite par H. Towbin et al., Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 76, 1979, 4350-4354, qui comprend les étapes suivantes :

- 20 • dénaturation par chauffage à 100°C pendant 10 min dans un tampon, dénommé tampon de charge, constitué de Tris 0,125 M, pH 6,8, SDS 4 %, bleu de bromophénol 0,002 %, glycérol 20 %,  $\beta$ -mercaptoéthanol 10 % (selon le protocole décrit par Laemmli U. K., 1970, Nature, 227, 680-685), suivie d'une centrifugation à 10 000 g ;
- 25 • séparation électrophorétique des différentes protéines contenues dans le solubilisé selon le protocole décrit par Laemmli (réf. ci-dessus) ;
- 30 • électrotransfert desdites protéines contenues dans le gel sur une membrane en PVDF (selon la technique de H. Towbin et al., 1979, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 4350-4354).

L'immunodétection est réalisée selon un protocole qui comprend les étapes suivantes :

- 35 • saturation de la membrane PVDF(fluorure de polyvinylidène) sur laquelle les protéines ont été transférées par incubation pendant au minimum 2 h à 37°C dans une solution de gélatine à 3 % dans du tampon phosphate salin contenant 0,05 % de détergent Tween 20.

- incubation (pendant 1 h à 37°C) en présence de l'immunsérum préparé précédemment (contenant les anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine recombinante), dilué au 1/10 000 dans du tampon phosphate salin.

5

- 3 lavages dans du tampon phosphate salin contenant 0,05 % de détergent Tween 20.

10 Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé à l'aide d'un système streptavidine-biotine conjugué à la phosphatase alcaline avec le kit RPN 23 d'Amersham ("Blotting detection kit"), utilisé selon les indications du fabricant.

15 L'empreinte obtenue montre, pour les cals et pour les feuilles de plantes de tabac transformées par le plasmide pPH100, la présence d'une protéine de poids moléculaire apparent d'environ  $26 \pm 3$  kDa, reconnue par les anticorps polyclonaux préparés dans la section 1.3a) et absente des cals et des feuilles de plantes de tabac témoins. Cette protéine a le même poids moléculaire apparent que l'oxalate oxydase purifiée obtenue dans la Section 1.

20 c) Mise en évidence de l'activité oxalate oxydase de la germinée de blé exprimée dans du tabac

25 L'activité oxalate oxydase de 6 extraits de cals et de feuilles de plantes de tabac transformées par le plasmide pPH100 est mesurée selon la méthode de Suguira et al., décrite Section 1. Les résultats sont regroupés dans le Tableau I ci-après :

Tableau I : Activité oxalate oxydase mesurée dans différents tabacs transgéniques

	Cals						Feuilles	
	Témoin	Transgéniques					Témoin	Transgénique
N° de l'échantillon	W38	2	26	65	81	86	W 38	400
Activité (U oxox/ml d'extrait)	1,0	10,5	10,1	16,0	2,8	3,0	0,0	5,4

30

W38 = tabac témoin non transformé

On constate à la lecture du tableau ci-dessus que le tabac transgénique (cals ou feuilles) présente une activité oxalate oxydase significativement supérieure à celle du tabac témoin.

5      5) Sélection sur acide oxalique des régénérants

a) Protocole de sélection

Des disques de feuilles de plantes axéniques de tabac *Nicotiana tabacum* (variété Wisconsin Havana 38) sont incubés dans une culture d'*A. tumefaciens* hébergeant le plasmide pPH100. Les disques égouttés sur papier Whatman sont mis en culture sur des milieux de culture en boîtes de Pétri afin de multiplier les cellules transformées de façon à obtenir des cals. Après trois jours, les disques de feuilles sont rincés dans de l'éthanol 80 % puis dans du milieu gélosé de Murashige et Skoog (1962, Physiol. Plant. 15, 473) contenant 500 µg/ml de cefotaxime. Ils sont ensuite transférés sur un milieu contenant de l'acide oxalique afin de sélectionner les amas cellulaires exprimant l'oxalate oxydase.

20      2. Mode de préparation des milieux de culture

L'acide oxalique s'associant au calcium pour former un sel d'oxalate de calcium insoluble, le milieu de sélection doit être préparé selon un protocole permettant de conserver le calcium sous une forme soluble utilisable par les cellules végétales malgré la présence d'acide oxalique.

25      Préparation de la solution A :

Pour chaque concentration, 50 ml d'une solution d'acide oxalique concentrée 20 fois par rapport à la concentration finale attendue, sont ajustés à pH 5,8 avec une solution d'hydroxyde de potassium (KOH) 3M. La solution est ajustée à 100 ml avec de l'eau désionisée, stérilisée par filtration sur filtre de 0,45 µm, puis maintenue à une température de 50°C jusqu'à son utilisation.

35      Préparation de la solution B :

258 mg d'EGTA (acide éthylène glycol-bis(β-amino ethyl ether) N,N,N',N'-tetraacétique) (Sigma, ref. E. 4378) sont mis en solution dans 100 ml d'eau désionisée. L'EGTA est solubilisé en ajustant le pH à 10,0 avec une solution de

KOH 10 M. 100 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  sont ensuite ajoutés et le pH de la solution est ajusté à 5,8 avec une solution HCl 2M. Le volume est ajusté à 150 ml puis la solution est stérilisée par passage sur filtre de 0,45  $\mu\text{m}$ .

5 Incorporation du calcium et de l'oxalate au milieu de culture :

750 ml de milieu de culture gélosé de Murashige et Skoog (1962, Physiol. Plant. 15, 473) sans chlorure de calcium, concentré 1,33 fois, sont autoclavés pendant 20 min à 120°C. La température est ensuite abaissée à 50°C et les solutions A et B incorporées dans ce milieu. Après homogénéisation de la solution, le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri.

c) Détermination de la dose d'acide oxalique à utiliser pour la sélection

15 Une gamme de sensibilité à l'acide oxalique de cals de tabac non transgénique (variété Wisconsin Havana 38) a été établie. Les milieux de culture ont été préparés selon le protocole décrit ci-dessus. Pour chaque concentration d'acide oxalique, 4 boîtes contenant 25 cals de diamètre de 2 mm et d'un poids moyen de 10 mg ont été mis en culture. Les résultats, exprimés en % d'inhibition de croissance pondérale par rapport aux cals témoins, sont présentés dans le tableau II ci-après :

25 Tableau II : Inhibition de la croissance pondérale de cals de tabac par l'acide oxalique

Conc. Ac oxalique ( $\mu\text{g/ml}$ )	0	40	60	80	120	180	270
Inhib. croissance pondérale	0 %	0 %	12 %	19 %	51 %	89 %	99 %

Compte tenu des résultats ci-dessus, la dose de sélection choisie est de 270  $\mu\text{g/ml}$  (3mM).

d) Utilisation du gène codant pour l'oxalate oxydase comme gène de sélection des transformants

35 Après transformation et induction de la callogénèse, les disques foliaires de tabac sont transférés sur un milieu contenant 270  $\mu\text{g/ml}$  d'acide oxalique. A cette concentration, les cals exprimant l'oxalate oxydase ne présentent pas une

croissance différente du témoin poussant sur un milieu dépourvu d'acide oxalique et sont capables de survivre et de produire des plantes transgéniques. Le fait que les plantules régénérées sont bien transgéniques est vérifié par leur résistance à la kanamycine (second gène de sélection porté par le plasmide pPH100). Sur 29  
5 plantes sélectionnées sur acide oxalique, 28 sont également résistantes à la kanamycine.

La sélection sur l'acide oxalique a donc permis de sélectionner les cals transformants ainsi que les plantes transgéniques.

10

### SECTION 3 : Transformation du tournesol par le gène de la germinine de blé, sélection sur acide oxalique des cals

#### 1) Transformation du tournesol

15

#### Obtention de cals de tournesol transformés

Des graines de tournesol immatures sont prélevées sur le capitule de plantes de tournesol de la lignée HA89 bien connue, étudiée notamment par P.J. Goyne et al., Journal Article n° 1534 of the North Dakota State Univ. Agric. Exp. Stn. Fargo ND-58105, et par M.F. Geriani, Plant Cell Physiol, 33, 2, 157-164. Ces graines sont  
20 stérilisées en surface pendant 30 min dans une solution d'hypochlorite de calcium à 2 %, puis rincées à l'eau distillée stérile.

25

Les embryons immatures sont prélevés sur ces graines et mis en culture sur le milieu I (tableau III) pendant 14 jours à 25°C et à l'obscurité. Ces embryons sont ensuite cultivés pendant 10 jours sur le milieu II à 25°C sous une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit.

30

Les embryons sont alors coupés en deux au niveau de l'axe embryonnaire et mis à tremper pendant 10 min dans une suspension d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le vecteur binaire pPH100 (cf. sections 2.1 et 2.2). Cette suspension est obtenue par culture de cette bactérie pendant 15 h dans le milieu Luria liquide.

35

Les embryons sont ensuite égouttés sur du papier filtre stérile, puis remis en culture sur le milieu II à l'obscurité pendant 3 jours. Les embryons sont alors brièvement rincés par du milieu Murashige et Skoog liquide (Murashige et Skoog,



1962, Physiol. Plant 15 : 473) contenant 500 mg/l de l'antibiotique cefotaxime. Ils sont ensuite égouttés sur du papier filtre stérile et mis en culture sur du milieu III contenant 250 mg/l de cefotaxime, 250 mg/l de carbenicilline et 50 mg/l de paromomycine. Cette culture s'effectue à 25°C sous une photopériode de 16 h jour / 8 h nuit ; les tissus végétaux ainsi que les cals se développant à leur surface sont repiqués tous les 21 jours sur ce même milieu.

Tableau III : Composition des différents milieux utilisés pour l'obtention de plantes de tournesol transformées

Milieux	I	II	III
Composition mg/l			
KNO <sub>3</sub>	2500	2500	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	1650
CaCl <sub>2</sub> . 2H <sub>2</sub> O	150	150	440
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	250	250	370
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	170
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	134	134	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	150	150	-
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	10	10	-
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	2	2	8,6
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3	3	6,2
KI	0,75	0,75	0,83
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	0,25
CaCl <sub>2</sub> . 6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,025
Mn SO <sub>4</sub> . 4H <sub>2</sub> O	-	-	22,3
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37,3	37,3
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8
Acide nicotinique	1	1	0,5
Thiamine HCl	10	10	0,1
Pyridoxine HCl	1	1	0,1
Myc-inositol	4000	4000	100
L-alanine	1000	1000	-
L-glutamine	800	800	-
L-serine	160	160	-
L-tryptophane	50	50	-
L-cystéine	10	10	-

Tableau III : suite

Milieux	I	II	III
Composition mg/l			
Ca-D-panthoténate	-	-	0,8
Acide folique	-	-	0,1
Chlorure de choline	-	-	0,1
Acide 4-aminobenzoïque	-	-	0,05
Riboflavine	-	-	0,05
Saccharose	120 000	60 000	30 000
Acide 2,4-dichloroPhenoxy acétique	2	-	-
6-Benzylaminopurine	-	0,4	-
Kinétine	-	-	1
Agar	7000	7000	7000
pH	5.7	5.8	5.7

## 2) Mise en évidence de l'expression du gène de la germinine dans le tournesol transgénique

5

### a) Préparation des extraits protéiques

Se fait d'une manière identique à celle décrite dans la Section 2 4)a).

10

### b) Immunodétection de l'oxalate oxydase (Western blot) dans des cals

L'immunodétection, effectuée selon le protocole décrit dans la Section 2 4)b), met en évidence, dans des cals et des feuilles de tournesol transformé par le plasmide pPH100, la présence d'une protéine surnuméraire de poids moléculaire apparent d'environ  $26 \pm 3$  kDa. Cette protéine, absente des cals et des feuilles de plantes témoins, a le même poids moléculaire apparent que l'oxalate oxydase purifiée obtenue dans la Section 1.

20

c) Activité oxalate oxydase de la germe de blé exprimée dans du tournesol

L'activité oxalate oxydase de 5 extraits de protéines de cals de tournesol transformés par le plasmide pPH100 est mesurée selon la méthode de Sugira et al., décrite Section 1. Les résultats montrent une activité oxalate oxydase significativement supérieure à celle de l'extrait témoin.

Tableau IV : Activité oxalate oxydase de cals de tournesol transgéniques

N° du cal	Témoin non transformé	17	18	19	20	21
Unité Ox Ox/mg prot/min	0,0	9,5	0,7	0,8	0,6	1,4

3) Sélection sur acide oxalique des cals transgéniques

La sélection des cals transgéniques est réalisée en cultivant le matériel végétal issu du milieu III (cf. ci-dessus 1) sur un milieu Murashige et Skoog de sélection préparé selon le protocole décrit dans la Section 2 5)b) .

La détermination de la dose de sélection à appliquer au cours de la culture de cals de tournesol se fait selon la méthode décrite dans la Section 2 5)c), cette méthode étant appliquée à des cals non transgéniques de tournesol obtenus à partir d'embryons immatures. Les résultats sont présentés dans le tableau V :

Tableau V : Inhibition de la croissance pondérale du tournesol par l'acide oxalique

Conc. Ac oxalique (µg/ml)	0	40	70	90	140	180	235	270
Inhib. croissance pondérale	0 %	0 %	0 %	0 %	42 %	92 %	97 %	99 %

La dose d'acide oxalique permettant de réaliser la sélection est de 270 µg/ml (3mM). A cette concentration, les cals exprimant l'oxalate oxydase ne présentent pas d'inhibition de croissance.

**SECTION 4 : Utilisation de la sélection sur acide oxalique pour obtenir des plantes transgéniques exprimant un gène d'intérêt, codant, par exemple, pour une protéine à activité endochitinase.**

5            1) Construction du vecteur de transformation

a) Préparation du fragment portant le gène codant pour l'oxalate oxydase

10            Le fragment HindIII – EcoRI de 1420 pb environ du plasmide pPH100 décrit dans la section 2 d) est purifié et recloné dans un vecteur pUC19 selon les méthodes bien connues de l'homme de l'art. Ce plasmide est ensuite linéarisé grâce à l'endonuclease de restriction EcoRI et l'extrémité cohésive est remplie au moyen du fragment de Klenow. Puis, après coupure par l'endonuclease HindIII, le fragment  
15 HindIII – extrémité franche est purifié.

b) Préparation du fragment portant un gène hybride codant pour une protéine à activité endochitinase

20            Le fragment HindIII – EcoRI provenant du plasmide pBR1 décrit dans la demande de brevet de WO 92/01792 exemple 1 et contenant un gène chimérique codant pour une protéine à activité endochitinase qui comprend le promoteur 35 S, une séquence codant pour une chitinase hybride tomate-tabac et le terminateur NOS est purifié, recloné dans le vecteur pUC19, puis le site HindIII est détruit d'une  
25 manière classique. Le fragment extrémité franche – EcoRI est purifié.

c) Préparation d'un vecteur de transformation des plantes ne comportant pas de gène de résistance à la kanamycine

30            Le fragment NheI – HindIII comprenant la partie codant pour le gène de résistance à la kanamycine est éliminé du T-DNA du plasmide pBIN19 (cf Section 2 1 d). L'utilisation, selon les méthodes bien connues de l'homme de l'art, des oligonucléotides CTAGCA et AGCTTG permet de recirculariser le plasmide en créant les sites de restriction NheI et HindIII. Le plasmide résultant est ensuite  
35 linéarisé par les endonucléases de restriction HindIII et EcoRI.

## d) Assemblage du vecteur de transformation

On a ligué à l'aide de l'ADN ligase T4 le gène codant pour l'oxalate oxydase obtenu en a) ci-dessus) et le gène chimérique codant pour une protéine à activité chitinase (obtenu en b) ci-dessus) dans un vecteur binaire pBIN19 dans lequel on a éliminé le gène de résistance à la kanamycine s'exprimant dans les plantes (obtenu en c) ci-dessus).

Le vecteur obtenu, appelé pPH 106, est cloné dans la souche E. Coli HB 101 (Clontech)

2) Transformation d'Agrobacterium tumefaciens

La transformation est réalisée selon la méthode décrite dans la section 2 2).

3) Transformation du tabac

Du tabac Nicotiana tabacum cultivé in vitro est infecté par Agrobacterium tumefaciens contenant le plasmide pPH106 selon la procédure de Horsch et al., bien connue de l'homme du métier (Horsch R.B. et al., 1985 Science 227, 1229-1231), dont les principales étapes sont exposées ci-après.

Des disques de feuilles de plantes axéniques de tabac Nicotiana tabacum (variété Wisconsin Havana 38) sont incubés dans une culture d'A. tumefaciens hébergeant le plasmide pPH106. Les disques égouttés sur papier Whatman sont mis en culture sur des milieux de culture en boîtes de Pétri afin de multiplier les cellules transformées de façon à obtenir des cals. Après 48 heures, les disques sont rincés dans de l'éthanol 80 % puis dans du milieu gélosé de Murashige et Skoog (1962, Physiol. Plant. 15, 473) contenant 500 µg/ml de céfotaxime. Ils sont ensuite transférés pour 3 jours sur du milieu contenant de la céfotaxime à 500 µg/ml destinée à décontaminer les tissus végétaux (élimination des Agrobacterium tumefaciens).

#### 4) Sélection sur acide oxalique des régénérants

Après transformation et induction de la callogénèse, les disques foliaires de tabac sont transférés sur un milieu contenant 270 µg/ml d'acide oxalique préparé selon la méthode décrite dans la section 2 5)b). Seuls les cals transgéniques exprimant le gène de l'oxalate oxydase, donc capables de dégrader l'acide oxalique, sont capables de survivre et de produire des plantes transgéniques.

#### 5) Mise en évidence de l'expression de la protéine à activité endochitinase dans les tabacs transgéniques sélectionnés sur acide oxalique

##### a) Préparation des extraits bruts de protéines de tabac transformé

Cette préparation est effectuée selon la méthode décrite dans la section 2 4)a)

##### b) Mise en évidence de la chitinase hybride par immuno-empreinte (Western blot)

On soumet les extraits bruts de protéines à un Western blot, technique bien connue de l'homme de l'art et décrite par H. Towbin et al., Proc. Ntl. Acad. Sci. USA, 76, 1979, 4350-4354, qui comprend notamment les étapes mentionnées dans la section 2.4)b)

L'immunodétection de la protéine d'intérêt se réalise grâce à un immunosérum contenant des anticorps polyclonaux reconnaissant la protéine hybride à activité chitinase (cf. WO 92/01792 exemple 5).

Le complexe antigène-anticorps est ensuite révélé à l'aide d'un système streptavidine-biotine conjugué à la phosphatase alcaline avec le kit RPN 23 d'Amersham ("Blotting detection kit"), utilisé selon les indications du fabricant.

L'empreinte obtenue montre, pour les feuilles de plantes de tabac transformées par le plasmide pPH106, la présence d'une protéine de poids moléculaire apparent d'environ  $26 \pm 6$  kDa reconnue par les anticorps polyclonaux et absente des feuilles des plantes de tabac témoins. Cette protéine a le même poids moléculaire apparent que la protéine hybride à activité chitinase décrite dans la demande WO 92/01792.

c) Mise en évidence de l'activité chitinolytique de la protéine recombinante

- 5 L'activité chitinolytique des extraits bruts de protéines de feuilles de 5 plantes de tabac transformé par le plasmide pPH 106 (plantes n° 463, 464, 465, 468 et 469) et d'extrait brut de protéines de feuilles de plantes de tabac non transformé (plante W 38) est mesurée selon la méthode suivante :
- 10 L'activité endochitinase de la protéine est mesurée par une méthode radiochimique permettant d'estimer la quantité de monomères ou d'oligomères libérés par l'enzyme à partir d'un substrat (la chitine tritiée). Cette méthode, décrite par Molano et al. (1977, Anal. Biochem., 83, 648-656), est résumée ci-après.
- 15 A un volume d'extrait protéique de 10  $\mu$ l sont ajoutés 50  $\mu$ l d'une suspension de chitine tritiée d'activité spécifique 0,58 MBq/ml. Le volume final est ajusté à 300  $\mu$ l avec du tampon d'acétate de sodium 0,2 M de pH 5,0. Après 90 min d'incubation à 30°C, la réaction d'hydrolyse de la chitine est arrêtée par 100  $\mu$ l d'acide trichloracétique à 20 %. Les tubes réactionnels sont ensuite centrifugés
- 20 pendant 10 min à 12 000 g. Une partie aliquote de 100  $\mu$ l du surnageant renfermant les oligomères solubles de chitine est prélevée et la radioactivité correspondante est mesurée par scintillation liquide en présence de 5 ml de mélange scintillant. On exprime l'activité chitinolytique spécifique en dpm/ $\mu$ g de protéine.
- 25 Pour les 5 plantes sélectionnées sur acide oxalique, on obtient les valeurs suivantes :

genotype	W 38	463	464	465	468	469
Activité spécifique DPM/ $\mu$ g prot	95	149	348	318	301	320

(W 38 = tabac témoin non transformé)

30

On constate sur le tableau ci-dessus que les extraits de plantes de tabac transformé par le plasmide pPH106 ont une activité chitinolytique significativement supérieure à celle de l'extrait de plantes de tabac-témoin. La sélection sur acide oxalique permet donc d'obtenir des plantes exprimant un gène d'intérêt, en

l'occurrence le gène hybride codant pour une protéine à activité chitinase décrit dans la demande de brevet WO 92/01792.



## LISTE DE SEQUENCES

## (1) INFORMATION GENERALE:

5

## (i) DEPOSANT:

- (A) NOM: ELF SANOFI
- (B) RUE: 32-34 rue Marbeuf
- (C) VILLE: PARIS
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 75008
- (G) TELEPHONE: 40.73.40.73
- (H) TELECOPIE: 40.73.23.84

10

15

- (A) NOM: SOCIETE NATIONALE ELF AQUITAINE
- (B) RUE: Tour Elf-002 Place de la Coupole LA DEFENSE 6
- (C) VILLE: COURBEVOIE
- (E) PAYS: France
- (F) CODE POSTAL: 92400
- (G) TELEPHONE: 47.44.45.46

20

(ii) TITRE DE L' INVENTION: Utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique à titre de gène de sélection

25

(iii) NOMBRE DE SEQUENCES: 20

## (iv) FORME LISIBLE PAR ORDINATEUR:

- (A) TYPE DE SUPPORT: Floppy disk
- (B) ORDINATEUR: IBM PC compatible
- (C) SYSTEME D' EXPLOITATION: PC-DOS/MS-DOS
- (D) LOGICIEL: PatentIn Release #1.0, Version #1.25 (OEB)

30

## (vi) DONNEES DE LA DEMANDE ANTERIEURE:

- (A) NUMERO DE DEPOT: FR 92 14721
- (B) DATE DE DEPOT: 07-DEC-1992

35

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 1:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 224 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

## 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 1:

Met Gly Tyr Ser Lys Thr Leu Val Ala Gly Leu Phe Ala Met Leu Leu  
 1 5 10 15

15 Leu Ala Pro Ala Val Leu Ala Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe  
 20 25 30

Cys Val Ala Asp Leu Asp Gly Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr  
 35 40 45

20 Cys Lys Pro Met Ser Glu Ala Gly Asp Asp Phe Leu Phe Ser Ser Lys  
 50 55 60

25 Leu Ala Lys Ala Gly Asn Thr Ser Thr Pro Asn Gly Ser Ala Val Thr  
 65 70 75 80

Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr Asn Thr Leu Gly Val Ser  
 85 90 95

30 Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly Thr Asn Pro Pro His Ile  
 100 105 110

His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Ile Val Met Lys Gly Glu Leu Leu  
 115 120 125

35 Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Arg  
 130 135 140

Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ile Pro Arg Gly Leu Met His  
 145 150 155 160

Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala Ser Met Val Val Ser Phe  
 5 165 170 175

Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val Pro Leu Thr Leu Phe Gly  
 180 185 190

Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu Thr Lys Ala Leu Arg Val  
 10 195 200 205

Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser Lys Phe Ala Ala Gly Phe  
 15 210 215 220

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 2:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 20 (A) LONGUEUR: 672 paires de bases  
 (B) TYPE: acide nucléique  
 (C) NOMBRE DE BRINS: simple  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

25 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 2:

ATGGGGTACT CCAAAACCCT AGTAGCTGGC GTGTTGCGAA TGCTGTTACT AGCTCCGGCC 60  
 30 GTCTTGGCCA CCGACCCAGA CCCTCTCCAG GACTTCTGTG TCGCCGACCT CGACGGCAAG 120  
 GCGGTCTCGG TGAACGGGCA CACGTGCAAG CCCATGTCGG AGGCCGGCGA CGACTTCCTC 180  
 35 TTCTCGTCCA AGTTGGCCAA GGCCGGCAAC ACGTCCACCC CGAACGGCTC CGCCGTGACG 240  
 GAGCTCGACG TGGCCGAGTG GCCCGGTACC AACACGCTGG GTGTGTCCAT GAACCGCGTG 300

GACTTTGCTC CCGGAGGCAC CAACCCACCA CACATCCACC CGCGTGCCAC CGAGATCGGC 360

ATCGTGATGA AAGGTGAGCT TCTCGTGGGA ATCCTTGGCA GCCTCGACTC CGGGAACAAG 420

5 CTCTACTCGA GGGTGGTGCG CGCCGGAGAG ACGTTCCTCA TCCCACGGGG CCTCATGCAC 480

TTCCAGTTCA ACGTCGGTAA GACCGAGGCC TCCATGGTCG TCTCCTTCAA CAGCCAGAAC 540

CCCGGCATTG TCTTCGTGCC CCTCAGCTC TTCGGCTCCA ACCCGCCCAT CCCAACGCCC 600

10 GTGCTCACCA AGGCACTCCG GGTGGAGGCC AGGTCGTGG AACTTCTCAA GTCCAAGTTT 660

GCCGCTGGGT TT 672

15 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 3:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 254 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

20 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 3:

25

Gly Gly Asp Leu Gly Ser Val Ile Ser Asn Ser Met Phe Asp Gln Met  
1 5 10 15

30

Leu Lys His Arg Asn Glu Asn Ser Cys Gln Gly Lys Asn Asn Phe Tyr  
20 25 30

Ser Tyr Asn Ala Phe Ile Thr Ala Ala Arg Ser Phe Pro Gly Phe Gly  
35 40 45

35

Thr Ser Gly Asp Ile Asn Ala Arg Lys Arg Glu Ile Ala Ala Phe Phe  
50 55 60

Ala Gln Thr Ser His Glu Thr Thr Gly Gly Trp Pro Ser Ala Pro Asp  
65 70 75 80

5 Gly Pro Phe Ala Trp Gly Tyr Cys Phe Leu Arg Glu Arg Gly Asn Pro  
85 90 95

Gly Asp Tyr Cys Ser Pro Ser Ser Gln Trp Pro Cys Ala Pro Gly Arg  
100 105 110

10 Lys Tyr Phe Gly Arg Gly Pro Ile Gln Ile Ser His Asn Tyr Asn Tyr  
115 120 125

Gly Pro Cys Gly Arg Ala Ile Gly Val Asp Leu Leu Asn Asn Pro Asp  
130 135 140

15 Leu Val Ala Thr Asp Pro Val Ile Ser Phe Lys Thr Ala Ile Trp Phe  
145 150 155 160

Trp Met Thr Pro Gln Ser Pro Lys Pro Ser Cys His Asp Val Ile Ile  
20 165 170 175

Gly Arg Trp Asn Pro Ser Ala Gly Asp Arg Ser Ala Asn Arg Leu Pro  
180 185 190

25 Gly Phe Gly Val Ile Thr Asn Ile Ile Asn Gly Gly Leu Glu Cys Gly  
195 200 205

Arg Gly Asn Asp Asn Arg Val Gln Asp Arg Ile Gly Phe Tyr Arg Arg  
210 215 220

30 Tyr Cys Gly Ile Leu Gly Val Ser Pro Gly Asp Asn Leu Asp Cys Gly  
225 230 235 240

Asn Gln Arg Ser Phe Gly Asn Gly Leu Leu Val Asp Thr Met  
35 245 250

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 4:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 24 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## 10 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 4:

Met Arg Arg Thr Ser Lys Leu Thr Thr Phe Ser Leu Leu Phe Ser Leu  
1 5 10 15

15 Val Leu Leu Ser Ala Ala Leu Ala  
20

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 5:

## 20 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 51 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## 25 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 5:

30 Gln Asn Cys Gly Ser Gln Gly Gly Gly Lys Val Cys Ala Ser Gly Gln  
1 5 10 15

Cys Cys Ser Lys Phe Gly Trp Cys Gly Asn Thr Asn Asp His Cys Gly  
20 25 30

35 Ser Gly Asn Cys Gln Ser Gln Cys Pro Gly Gly Gly Pro Gly Pro Gly  
35 40 45

Pro Val Thr

50

## 5 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 6:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 10 (A) LONGUEUR: 1153 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

## 15 (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- (A) NOM/CLE: intron  
(B) EMPLACEMENT: 443..521

## (ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

- 20 (A) NOM/CLE: intron  
(B) EMPLACEMENT: 676..756

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 6:

25 ATGAGGCGAA CTTCTAAATT GACTACTTTT TCTTTGCTGT TTTCTCTGGT TTTGCTGAGT 60  
GCTGCCTTGG CACAGAATTG TGGTTCACAG GGCGGAGGCA AAGTTTGTGC GTCGGGACAA 120  
TGTTGCAGCA AATTCCGGGTG GTGCGGTAAC ACTAATGACC ATTGTGGTTC TGGCAATTGT 180  
30 CAAAGTCAGT GTCCAGGTGG CGGCCCTGGT CCTGGTCCTG TTA CTGGTGG GGACCTCGGA 240  
AGCGTCATCT CAAATTCTAT GTTTGATCAA ATGCTTAAGC ATCGTAACGA AAATTCTTGT 300  
35 CAAGGAAAGA ATAATTTCTA CAGTTACAAT GCCTTTATTA CTGCTGCTAG GTCTTTTCCT 360  
GGCTTTGGTA CAAGTGGTGA TATCAATGCC CGTAAAAGGG AAATTGCTGC TTTCTTTGCC 420

CAAACCTCCC ATGAAACTAC TGGTATGTGT ATAACCATTG ACATCGAACC ATTAAAATAT 480  
AATTTTCATTT TATTTTATTT AGTAATTGAT TATATATGTA GGAGGATGGC CTTCCGCACC 540  
5 TGATGGACCA TTCGCATGGG GTTACTGTTT CCTTAGAGAA CGAGGTAACC CCGGTGACTA 600  
CTGTTACCA AGTAGTCAAT GGCCTTGTGC ACCTGGAAGG AAATATTTTCG GACGAGGCCC 660  
AATCCAAATT TCACAGTAAG CTACATAAAT CTATATATGG TAAAATTTGA TGAAC TTGTA 720  
10 GTGTCTAATT ACGTGTATTT TGACATTTC AAACAGCAAC TACAACTATG GGCCATGTGG 780  
AAGAGCCATC GGAGTGGACC TTTTAAACAA TCCTGATTTA GTAGCCACAG ACCCAGTCAT 840  
15 CTCATTCAAG ACTGCTATCT GGTCTGGAT GACCCCTCAA TCACCAAAGC CTTCTTGCCA 900  
CGATGTCATC ATTGGAAGAT GGAACCCATC TGCCGGTGAC CGATCAGCCA ATCGTCTTCC 960  
TGGATTTGGT GTCATCACA ACATCATCAA TGGGGGCCTG GAATGTGGTC GTGGCAATGA 1020  
20 CAATAGGGTC CAGGATCGCA TTGGGTTTTA CAGGAGGTAT TGCGGTATTC TTGGTGTTAG 1080  
TCCTGGTGAC AATCTTGATT GCGGAAACCA GAGATCTTTT GGAAACGGAC TTTTAGTCGA 1140  
25 TACTATGTAA TGA 1153

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 7:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:  
30 (A) LONGUEUR: 389 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 7:



Gly Ser Gly Phe Ala Asn Ala Val Tyr Phe Thr Asn Trp Gly Ile Tyr  
 1 5 10 15  
 Gly Arg Asn Phe Gln Pro Ala Asp Leu Pro Ala Ser Glu Ile Thr His  
 5 20 25 30  
 Val Leu Tyr Ser Phe Met Asn Val Arg Ala Asp Gly Thr Ile Phe Ser  
 35 40 45  
 Gly Asp Thr Tyr Ala Asp Tyr Glu Lys His Tyr Ala Gly Asp Ser Trp  
 10 50 55 60  
 Asn Asp Val Gly Thr Asn Ala Tyr Gly Cys Val Lys Gln Leu Tyr Leu  
 15 65 70 75 80  
 Leu Lys Lys Gln Asn Arg Asn Met Lys Val Met Leu Ser Ile Gly Gly  
 85 90 95  
 Trp Thr Tyr Ser Thr Asn Phe Pro Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Thr  
 20 100 105 110  
 Arg Lys Thr Phe Ala Gln Ser Ala Val Gly Phe Met Lys Asp Trp Gly  
 115 120 125  
 Phe Asp Gly Ile Asp Ile Asp Trp Glu Tyr Pro Ala Asp Ala Thr Gln  
 25 130 135 140  
 Ala Gln Asn Met Val Leu Leu Leu Gln Ala Val Arg Ser Glu Leu Asp  
 145 150 155 160  
 Ser Tyr Ala Ala Gln Tyr Ala Lys Gly His His Phe Leu Leu Ser Ile  
 165 170 175  
 Ala Ala Pro Ala Gly Pro Asp Asn Tyr Asn Lys Leu Lys Phe Ala Glu  
 35 180 185 190  
 Leu Gly Lys Val Leu Asp Tyr Ile Asn Leu Met Ala Tyr Asp Tyr Ala  
 195 200 205

	Gly Ser Trp Ser Asn Tyr Thr Gly His Asp Ala Asn Ile Tyr Ala Asn	
	210	220
5	Pro Gln Asn Pro Asn Ala Thr Pro Tyr Asn Thr Asp Asp Ala Val Gln	
	225	240
	Ala Tyr Ile Asn Gly Gly Val Pro Ala Asn Lys Ile Val Leu Gly Met	
	245	255
10	Pro Ile Tyr Gly Arg Ser Phe Gln Gln Thr Glu Gly Ile Gly Lys Pro	
	260	270
	Tyr Asn Gly Ile Gly Ser Gly Ser Trp Glu Asn Gly Ile Trp Asp Tyr	
15	275	285
	Lys Ala Leu Pro Lys Ala Gly Ala Thr Val Lys Cys Asp Asp Thr Ala	
	290	300
20	Lys Gly Cys Tyr Ser Tyr Asp Pro Ser Thr Lys Glu Leu Ile Ser Phe	
	305	320
	Asp Thr Pro Ala Met Ile Ser Thr Lys Val Ser Trp Leu Lys Gly Lys	
	325	335
25	Gly Leu Gly Gly Ser Met Phe Trp Glu Ala Ser Ala Asp Lys Lys Gly	
	340	350
	Ser Asp Ser Leu Ile Ser Thr Ser His Gln Gly Leu Gly Ser Gln Asp	
30	355	365
	Ser Thr Gln Asn Tyr Leu Asp Tyr Pro Asn Ser Lys Tyr Asp Asn Ile	
	370	380
35	Lys Lys Gly Met Asn	
	385	

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 8:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 5 (A) LONGUEUR: 22 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## 10 (vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: signal peptide

## (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 8:

15 Met Leu Ser Phe Val Lys Lys Ser Ile Ala Leu Val Ala Ala Leu Gln  
1 5 10 15

Ala Val Thr Ala Leu Ala  
20

20

## (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 9:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 25 (A) LONGUEUR: 12 acides aminés  
(B) TYPE: acide aminé  
(D) CONFIGURATION: linéaire

## (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

## 30 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 9:

Thr Pro Ile Ser Ser Glu Ala Gly Val Glu Lys Arg  
1 5 10

## 35 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 10:

## (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 1167 paires de bases

- (B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

5 (ii) TYPE DE MOLECULE: ADNc

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 10:

10	GGTAGTGGTT TTGCAAATGC CGTCTACTTC ACCAACTGGG GCATTTATGG CCGCAACTTC	60
	CAGCCTGCCG ACCTTCCTGC CTCGGAGATT ACTCACGTAC TCTACTCCTT CATGAATGTC	120
	CGCGCAGATG GCACCATCTT TTCCGGTGAT ACCTATGCCG ACTACGAGAA GCACTACGCT	180
15	GGTGACTCTT GGAACGATGT GGGCACGAAC GCTTACGGTT GTGTTAAGCA ACTTTATCTT	240
	CTCAAGAAGC AGAACCGCAA CATGAAGGTG ATGCTGTCTG TTGGTGGTTG GACATGGTCT	300
	ACCAACTTCC CCGCTGCCGC CAGCTCGGCT GCTACCCGAA AGACTTTTGC TCAGTCTGCT	360
20	GTTGGCTTCA TGAAGGACTG GGGTTTCGAC GGTATTGATA TCGACTGGGA GTACCCCGCC	420
	GATGCCACTC AGGCTCAGAA TATGGTTCTC TTGCTACAGG CTGTCCGCAG TGAGCTCGAC	480
25	TCCTACGCTG CCCAGTACGC CAAGGGTCAC CACTTCCTGC TTTCAATTGC CGCCCCTGCT	540
	GGACCTGACA ATTATAACAA GCTGAAGTTT CCTGAGCTTG GCAAGGTTCT CGATTACATT	600
	AACCTCATGG CTTACGATTA CGCTGGATCT TGGAGCAACT AACTGGCCA CGATGCCAAC	660
30	ATATACGCAA ACCCGCAGAA CCCCAACGCC ACCCCTTACA ACACGGACGA TGCTGTCCAG	720
	GCCTATATCA ACGGCGGCGT CCCTGCCAAC AAGATCGTCC TTGGTATGCC AATCTACGCC	780
35	CGATCCTTCC AGCAAACCGA GGGTATCGGT AAGCCTTACA ATGGTATTGG CTCTGGTAGC	840
	TGGGAGAACG GSTATCTGGGA CTACAAGGCT CTCCCCAAGG CTGGTGCCAC CGTCAAGTGC	900

GACGATACCG CCAAGGGATG CTACAGCTAC GATCCAAGCA CTAAGGAGCT TATTTCTTTC 960  
 GATACGCCCG CTATGATCAG CACCAAAGTT AGCTGGCTCA AGGGCAAGGG CCTTGGCGGC 1020  
 5 AGCATGTTCT GGGAGGCTTC TGCCGACAAG AAGGGCTCGG ACTCTCTTAT TAGCACCAGC 1080  
 CACCAAGGTC TCGGTAGCCA GGACAGCACT CAGAACTACC TCGACTACCC TAACTCCAAG 1140  
 TACGACAACA TCAAGAAGGG CATGAAC 1167

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 11:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

15

(A) LONGUEUR: 309 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

20

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 11:

25

Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala Asn  
 1 5 10 15

Asp Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg Leu  
 20 25 30

30

Tyr Asp Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly Ile  
 35 40 45

Glu Leu Ile Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala Thr  
 50 55 60

35

Asn Pro Asp Thr Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn Phe  
 65 70 75 80

	Trp Pro Ser Val Lys Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val Ser
	85 90 95
5	Pro Val Gly Gly Ser Ser Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala Ile
	100 105 110
	Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln Ile
	115 120 125
10	Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe Pro
	130 135 140
	Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp Val Arg Ser Tyr Leu Asp Pro
15	145 150 155 160
	Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala Pro Leu Leu Val Asn Val
	165 170 175
20	Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg Asp Ile Ser Leu Pro
	180 185 190
	Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp Asp Gly Gln Tyr
	195 200 205
25	Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val His Ala Ala
	210 215 220
	Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser Glu Ser
30	225 230 235 240
	Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala Arg
	245 250 255
35	Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro Arg
	260 265 270
	Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp Glu
	275 280 285

Asn Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn Pro  
290 295 300

5 Asn Lys Gln Lys Lys  
305

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 12:

10 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 28 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

15 (ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 12:

20 Tyr Pro Phe Gly Phe Gly Gly Lys Arg Leu Gly Lys Val Val Ile Asp  
1 5 10 15

Asp Phe Asn Ala Thr Thr Ser Ile Lys Ser Asp Val  
20 25

25 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 13:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 338 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

30 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 13:

35

Gln Ile Gly Val Cys Tyr Gly Met Leu Gly Asn Asn Leu Pro Ser Ala  
1 5 10 15

	Asn Asp Val Ile Gly Leu Tyr Arg Ser Asn Asn Ile Lys Arg Met Arg	
	20	25 30
5	Leu Tyr Asp Pro Asn Gln Ala Ala Leu Glu Ala Leu Arg Asn Ser Gly	
	35	40 45
	Ile Glu Leu Ile Leu Gly Val Pro Asn Ser Asp Leu Gln Gly Leu Ala	
	50	55 60
10	Thr Asn Pro Asp Thr Ser Arg Gln Trp Val Gln Lys Asn Val Leu Asn	
	65	70 75 80
	Phe Trp Pro Ser Val Lys Ile Lys Tyr Val Ala Val Gly Asn Glu Val	
	85	90 95
15	Ser Pro Val Gly Gly Ser Ser Ser Val Ala Gln Tyr Val Leu Pro Ala	
	100	105 110
	Ile Gln Asn Val Tyr Gln Ala Ile Arg Ala Gln Gly Leu His Asp Gln	
20	115	120 125
	Ile Lys Val Ser Thr Ser Ile Asp Met Thr Leu Ile Gly Asn Ser Phe	
	130	135 140
25	Pro Pro Ser Gln Gly Ser Phe Arg Gly Asp Val Arg Ser Tyr Leu Asp	
	145	150 155 160
	Pro Ile Ile Gly Tyr Leu Val Tyr Ala Asn Ala Pro Leu Leu Val Asn	
	165	170 175
30	Val Tyr Pro Tyr Phe Ser Tyr Thr Gly Asn Pro Arg Asp Ile Ser Leu	
	180	185 190
	Pro Tyr Ala Leu Phe Thr Ala Pro Asn Val Val Val Trp Asp Gly Gln	
35	195	200 205
	Tyr Gly Tyr Gln Asn Leu Phe Asp Ala Met Leu Asp Ser Val His Ala	
	210	215 220



Ala Ile Asp Asn Thr Lys Ile Gly Tyr Val Glu Val Val Val Ser Glu  
 225 230 235 240

5 Ser Gly Trp Pro Ser Asp Gly Gly Phe Ala Ala Thr Tyr Asp Asn Ala  
 245 250 255

Arg Val Tyr Leu Asp Asn Leu Val Arg Arg Ala Asn Arg Gly Ser Pro  
 260 265 270

10 Arg Arg Pro Ser Lys Pro Thr Glu Thr Tyr Ile Phe Ala Met Phe Asp  
 275 280 285

Glu Asn Gln Lys Asn Pro Glu Ile Glu Lys His Phe Gly Leu Phe Asn  
 15 290 295 300

Pro Asn Lys Gln Lys Lys Tyr Pro Phe Gly Phe Gly Gly Lys Arg Leu  
 305 310 315 320

20 Gly Lys Val Val Ile Asp Asp Phe Asn Ala Thr Thr Ser Ile Lys Ser  
 325 330 335

Asp Val

25

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 14:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

30

(A) LONGUEUR: 32 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

35

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 14:

Met Pro Ser Leu Phe Ala Arg Asn Gln Arg Phe Ser Leu Ala Thr Leu  
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Leu Glu Leu Leu Thr Gly Asn Leu Arg Met Ala Asp Ala  
20 25 30

5 (2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 15:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- 10 (A) LONGUEUR: 927 paires de bases  
(B) TYPE: acide nucléique  
(C) NOMBRE DE BRINS: simple  
(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

15 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 15:

ATTGGTGTGT GTTATGGCAT GCTGGGCAAC AATCTACCGT CAGCAAACGA TGTTATAGGT 60  
CTTTATAGAT CAAATAACAT AAAGAGAATG AGACTCTATG ATCCTAATCA AGCTGCTCTA 120  
20 GAAGCACTTA GAAATTCTGG CATTGAACTC ATTCTTGGGG TGCCAAACTC TGACCTTCAA 180  
GGCCTTGCCA CCAATCCTGA CACTTCTCGT CAATGGGTGC AAAAAACGT GTTGAAC TTT 240  
25 TGGCCTAGTG TCAAAATCAA GTACGTGGCA GTTGGAATG AAGTGAGTCC CGTTGGAGGC 300  
TCTTCTTCGG TAGCCCAATA TGTTCTACCT GCCATCCAAA ATGTATACCA AGCAATAAGA 360  
GCTCAAGGCC TTCATGATCA AATCAAGGTT TCAACATCTA TTGACATGAC CCTAATAGGA 420  
30 AACTCTTTCC CTCCATCGCA AGGTTCTTC AGGGGTGATG TGAGATCATA CCTAGATCCC 480  
ATAATTGGGT ACTTGGTATA TGCAAATGCA CCATTACTAG TCAATGTGTA CCCTTATTTT 540  
35 AGTTACACTG GTAACCCCGG TGACATATCA CTTCCCTATG CTCTTTTCAC AGCACCAAAT 600  
GTTGTGGTAT GGGATGGTCA ATATGGGTAC CAAAATTTGT TTGATGCTAT GTTGGATTCA 660

GTACATGCAG CCATTGATAA CACTAAGATT GGTTATGTGG AGGTTGTTGT ATCCGAGAGT 720

GGGTGGCCAT CAGATGGAGG ATTTGCTGCC ACTTATGACA ACGCACGCGT GTACTTAGAC 780

5 AATTTGGTTC GTCGTGCTAA TAGAGGAAGC CCAAGAAGGC CTTCTGAAGCC CACTGAGACT 840

TATATATTTG CCATGTTCTGA TGAAAATCAA AAAAATCCAG AGATAGAGAA ACATTTTGGG 900

CTCTTCAATC CCAACAAACA AAAAAAA 927

10

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 16:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 751 paires de bases

15

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

20

(vii) SOURCE IMMEDIATE:

(B) CLONE: gf-2.8 de la germinale de blé

(ix) CARACTERISTIQUE ADDITIONELLE:

25

(A) NOM/CLE: CDS

(B) EMPLACEMENT: 21..692

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 16:

30 AAGCTTATTA CATAGCAAGC ATG GGG TAC TCC AAA ACC CTA GTA GCT GGC 50

Met Gly Tyr Ser Lys Thr Leu Val Ala Gly

1

5

10

GTG TTC GCA ATG CTG TTA CTA GCT CCG GCC GTC TTG GCC ACC GAC CCA 98

35 Val Phe Ala Met Leu Leu Leu Ala Pro Ala Val Leu Ala Thr Asp Pro

15

20

25

	GAC CCT CTC CAG GAC TTC TGT GTC GCC GAC CTC GAC GGC AAG GCG GTC	146
	Asp Pro Leu Gln Asp Phe Cys Val Ala Asp Leu Asp Gly Lys Ala Val	
	30 35 40	
5	TCG GTG AAC GGG CAC ACG TGC AAG CCC ATG TCG GAG GCC GGC GAC GAC	194
	Ser Val Asn Gly His Thr Cys Lys Pro Met Ser Glu Ala Gly Asp Asp	
	45 50 55	
10	TTC CTC TTC TCG TCC AAG TTG GCC AAG GCC GGC AAC ACG TCC ACC CCG	242
	Phe Leu Phe Ser Ser Lys Leu Ala Lys Ala Gly Asn Thr Ser Thr Pro	
	60 65 70	
15	AAC GGC TCC GCC GTG ACG GAG CTC GAC GTG GCC GAG TGG CCC GGT ACC	290
	Asn Gly Ser Ala Val Thr Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr	
	75 80 85 90	
20	AAC ACG CTG GGT GTG TCC ATG AAC CGC GTG GAC TTT GCT CCC GGA GGC	338
	Asn Thr Leu Gly Val Ser Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly	
	95 100 105	
25	ACC AAC CCA CCA CAC ATC CAC CCG CGT GCC ACC GAG ATC GGC ATC GTG	386
	Thr Asn Pro Pro His Ile His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Ile Val	
	110 115 120	
30	ATG AAA GGT GAG CTT CTC GTG GGA ATC CTT GGC AGC CTC GAC TCC GGG	434
	Met Lys Gly Glu Leu Leu Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly	
	125 130 135	
35	AAC AAG CTC TAC TCG AGG GTG GTG CGC GCC GGA GAG ACG TTC CTC ATC	482
	Asn Lys Leu Tyr Ser Arg Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ile	
	140 145 150	
40	CCA CGG GGC CTC ATG CAC TTC CAG TTC AAC GTC GGT AAG ACC GAG GCC	530
	Pro Arg Gly Leu Met His Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala	
	155 160 165 170	
45	TCC ATG GTC GTC TCC TTC AAC AGC CAG AAC CCC GGC ATT GTC TTC GTG	578
	Ser Met Val Val Ser Phe Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val	

175 180 185

CCC CTC ACG CTC TTC GGC TCC AAC CCG CCC ATC CCA ACG CCG GTG CTC 626  
 Pro Leu Thr Leu Phe Gly Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu  
 5 190 195 200

ACC AAG GCA CTC CGG GTG GAG GCC AGG GTC GTG GAA CTT CTC AAG TCC 674  
 Thr Lys Ala Leu Arg Val Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser  
 205 210 215

10 AAG TTT GCC GCT GGG TTT TAATTTCTAG GAGCCTTCCC TGAAATGATA 722  
 Lys Phe Ala Ala Gly Phe  
 220

15 ATTATATAAT TCCATATATG CATGCTAGC 751

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 17:

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

20 (A) LONGUEUR: 224 acides aminés  
 (B) TYPE: acide aminé  
 (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: protéine

25 (xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE SEQ ID NO: 17:

Met Gly Tyr Ser Lys Thr Leu Val Ala Gly Val Phe Ala Met Leu Leu  
 1 5 10 15

30 Leu Ala Pro Ala Val Leu Ala Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe  
 20 25 30

Cys Val Ala Asp Leu Asp Gly Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr  
 35 35 40 45

Cys Lys Pro Met Ser Glu Ala Gly Asp Asp Phe Leu Phe Ser Ser Lys  
 50 55 60

	Leu Ala Lys Ala Gly Asn Thr Ser Thr Pro Asn Gly Ser Ala Val Thr									
	65		70		75				80	
5	Glu Leu Asp Val Ala Glu Trp Pro Gly Thr Asn Thr Leu Gly Val Ser									
		85			90				95	
	Met Asn Arg Val Asp Phe Ala Pro Gly Gly Thr Asn Pro Pro His Ile									
		100			105				110	
10	His Pro Arg Ala Thr Glu Ile Gly Ile Val Met Lys Gly Glu Leu Leu									
		115			120				125	
	Val Gly Ile Leu Gly Ser Leu Asp Ser Gly Asn Lys Leu Tyr Ser Arg									
15		130			135				140	
	Val Val Arg Ala Gly Glu Thr Phe Leu Ile Pro Arg Gly Leu Met His									
		145			150				155	160
20	Phe Gln Phe Asn Val Gly Lys Thr Glu Ala Ser Met Val Val Ser Phe									
		165			170				175	
	Asn Ser Gln Asn Pro Gly Ile Val Phe Val Pro Leu Thr Leu Phe Gly									
		180			185				190	
25	Ser Asn Pro Pro Ile Pro Thr Pro Val Leu Thr Lys Ala Leu Arg Val									
		195			200				205	
	Glu Ala Arg Val Val Glu Leu Leu Lys Ser Lys Phe Ala Ala Gly Phe									
30		210			215				220	

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 18:

35 (i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

- (A) LONGUEUR: 38 acides aminés
- (B) TYPE: acide aminé
- (D) CONFIGURATION: linéaire

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 18:

5 Thr Asp Pro Asp Pro Leu Gln Asp Phe Xaa Val Ala Asp Leu Asp Gly  
1 5 10 15  
Lys Ala Val Ser Val Asn Gly His Thr Xaa Lys Pro Met Ser Glu Ala  
20 25 30  
10 Gly Asp Asp Phe Leu Phe  
35

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 19:

15

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 9 acides aminés

(B) TYPE: acide aminé

(D) CONFIGURATION: linéaire

20

(ii) TYPE DE MOLECULE: peptide

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 19:

25 Ala Gly Glu Thr Phe Val Ile Pro Arg  
1 5

(2) INFORMATION POUR LA SEQ ID NO: 20:

30

(i) CARACTERISTIQUES DE LA SEQUENCE:

(A) LONGUEUR: 10 paires de bases

(B) TYPE: acide nucléique

(C) NOMBRE DE BRINS: simple

(D) CONFIGURATION: linéaire

35

(ii) TYPE DE MOLECULE: ADN (génomique)

(xi) DESCRIPTION DE LA SEQUENCE: SEQ ID NO: 20:

AGCTGGATCC

10



## REVENDICATIONS

1. Utilisation d'une séquence d'ADN codant pour une protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique à titre d'agent de sélection de cellules végétales.
- 5 2. Utilisation selon la revendication 1, caractérisée en ce que ladite séquence d'ADN est associée à une séquence d'intérêt.
- 10 3. Utilisation selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisée en ce que la protéine susceptible de dégrader l'acide oxalique est une enzyme à activité oxydase.
- 15 4. Utilisation selon la revendication 3, caractérisée en ce que l'enzyme à activité oxydase est l'oxalate oxydase de séquence [SEQ ID N° 1] ci-après ou une séquence présentant un degré d'homologie élevé avec la séquence [SEQ ID N° 1] ci-après :

	Met	Gly	Tyr	Ser	Lys	Thr	Leu	Val	Ala	Gly	Leu	Phe	Ala	Met	Leu	Leu
	1				5					10					15	
20	Leu	Ala	Pro	Ala	Val	Leu	Ala	Thr	Asp	Pro	Asp	Pro	Leu	Gln	Asp	Phe
				20					25					30		
	Cys	Val	Ala	Asp	Leu	Asp	Gly	Lys	Ala	Val	Ser	Val	Asn	Gly	His	Thr
			35					40					45			
	Cys	Lys	Pro	Met	Ser	Glu	Ala	Gly	Asp	Asp	Phe	Leu	Phe	Ser	Ser	Lys
25		50					55				60					
	Leu	Ala	Lys	Ala	Gly	Asn	Thr	Ser	Thr	Pro	Asp	Gly	Ser	Ala	Val	Thr
	65					70				75					80	
	Glu	Leu	Asp	Val	Ala	Glu	Trp	Pro	Gly	Thr	Asn	Thr	Leu	Gly	Val	Ser
					85				90				95			
30	Met	Asn	Arg	Val	Asp	Phe	Ala	Pro	Gly	Gly	Thr	Asn	Pro	Pro	His	Ile
				100					105				110			
	His	Pro	Arg	Ala	Thr	Glu	Ile	Gly	Ile	Val	Met	Lys	Gly	Glu	Leu	Leu
			115					120					125			
	Val	Gly	Ile	Leu	Gly	Ser	Leu	Asp	Ser	Gly	Asn	Lys	Leu	Tyr	Ser	Arg
35		130					135					140				
	Val	Val	Arg	Ala	Gly	Glu	Thr	Phe	Leu	Ile	Pro	Arg	Gly	Leu	Met	His
	145					150				155				160		



dégrader l'acide oxalique, caractérisé en ce qu'il consiste à cultiver les cals ou les plantes sur un milieu de culture contenant de l'acide oxalique et du calcium en présence d'un agent chélateur ayant une affinité pour le calcium supérieure à celle de l'acide oxalique.

5

10. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que ladite séquence d'ADN est associée à une séquence d'intérêt.

10

11. Procédé selon la revendication 9, caractérisé en ce que les agents chélateurs sont choisis parmi l'EDTA et l'EGTA.

15

12. Procédé selon l'une quelconque des revendications 9 à 11 caractérisé en ce que les cals ou les plantes appartiennent à l'une des espèces Nicotiana tabacum, Helianthus annuus et Brassica napus.

Form FCT/LSA/210 (second sheet) (July 1992)

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	<p>J. BIOL. CHEM. vol. 266, no. 16, 5 June 1991, AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 10461 - 10469 B.G. LANE ET AL. 'Homologies between members of the germin gene family in hexaploid wheat and similarities between these wheat germins and certain Physarum spherulins' cited in the application see page 10463, left column, line 35 - page 10465, right column, line 21; figure 4</p> <p>-----</p>	1-12

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intern. Appl. No.

PCT/FR 93/01203

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO-A-9214824	03-09-92	AU-A- 1207492	15-09-92
WO-A-9215685	17-09-92	FR-A- 2673644	11-09-92
		AU-A- 1682092	06-10-92
		CN-A- 1065683	28-10-92
		EP-A- 0531498	17-03-93
WO-A-9201792	06-02-92	FR-A- 2665177	31-01-92
		AU-A- 8302791	18-02-92
		CA-A- 2067176	25-01-92
		EP-A- 0493581	08-07-92
		JP-T- 5501807	08-04-93

<b>A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE</b> CIB 5    C12N9/02    C12N9/24    C12N15/53    C12N15/56    C12N15/82 //C12N5/10, A01H5/00, A01N63/00		
Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB		
<b>B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE</b> Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement) CIB 5    C12N		
Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche		
Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si cela est réalisable, termes de recherche utilisés)		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS</b>		
Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	WO,A,92 14824 (IMPERIAL CHEMICAL INDUSTRIES PLC) 3 Septembre 1992 cité dans la demande voir revendications 1-20; figures 3-7 ---	1-12
A	WO,A,92 15685 (RHONE POULENC AGROCHEMIE) 17 Septembre 1992 voir page 1, ligne 1 - page 5, ligne 18 ---	1-12
A	WO,A,92 01792 (SANOFI) 6 Février 1992 cité dans la demande voir page 1, ligne 1 - page 8, ligne 19 --- -/--	1-12
<div style="display: flex; justify-content: space-between;"> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents         </div> <div> <input checked="" type="checkbox"/> Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe         </div> </div>		
<b>* Catégories spéciales de documents cités:</b> <div style="display: flex;"> <div style="flex: 1;"> <p>"A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent</p> <p>"E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date</p> <p>"L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)</p> <p>"O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens</p> <p>"P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée</p> </div> <div style="flex: 1;"> <p>"T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention</p> <p>"X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément</p> <p>"Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier</p> <p>"Z" document qui fait partie de la même famille de brevets</p> </div> </div>		
Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">17 Février 1994</div>		Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">04-03-1994</div>
Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tél. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Fonctionnaire autorisé  <div style="text-align: center; font-size: 1.2em;">Hornig, H</div>

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	<p>J. BIOL. CHEM. vol. 266, no. 16 , 5 Juin 1991 , AM. SOC. MOL. BIOL., INC., BALTIMORE, US; pages 10461 - 10469 B.G. LANE ET AL. 'Homologies between members of the germin gene family in hexaploid wheat and similarities between these wheat germins and certain Physarum spherulins' cité dans la demande voir page 10463, colonne de gauche, ligne 35 - page 10465, colonne de droite, ligne 21; figure 4</p> <p>-----</p>	1-12



# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Dem. Internationale No

PCT/FR 93/01203

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO-A-9214824	03-09-92	AU-A- 1207492	15-09-92
WO-A-9215685	17-09-92	FR-A- 2673644	11-09-92
		AU-A- 1682092	06-10-92
		CN-A- 1065683	28-10-92
		EP-A- 0531498	17-03-93
WO-A-9201792	06-02-92	FR-A- 2665177	31-01-92
		AU-A- 8302791	18-02-92
		CA-A- 2067176	25-01-92
		EP-A- 0493581	08-07-92
		JP-T- 5501807	08-04-93

